



TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL MEDIO MARINO

M^a Eugenia Villaverde de Súa

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS ALIMENTARIO (IIAA)

PROGRAMA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Santiago de Compostela
Enero 2017



Dña. M^a del Rosario Rodil Rodríguez y D. José Benito Quintana Álvarez, ambos profesores del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan,

A la licenciada **Dña. M^a Eugenia Villaverde de Súa** a la presentación del trabajo recogido en la memoria titulada **“DESARROLLO DE METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL MEDIO MARINO”**, que ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, para optar al Grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, Enero de 2017.

Dña. M^a del Rosario Rodil Rodríguez

D. José Benito Quintana Álvarez



AGRADECIMIENTOS

Escasas se quedan las páginas cuando llega el momento de despedirse de una etapa llena de buenos momentos y de recuerdos imborrables. Como en muchas ocasiones el camino estuvo lleno de altibajos, sin embargo, todo este satisfactorio trabajo no habría sido posible sin la ayuda y el aliento de muchas personas; por ello aprovecho estas breves líneas para agradecer a todas y a cada una de ellas su apoyo desinteresado y la confianza depositada en mí durante estos años.

En primer lugar, agradecer a mis directores, Charo y Tito, la confianza que me han brindado, así como los inestimables conocimientos por ellos transmitidos, que sin ningún tipo de duda serán de gran utilidad para ese, cada vez más, próximo futuro. Valoraré siempre, tanto a nivel personal como profesional, la oportunidad que me habéis dado para realizar este trabajo a vuestro lado.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación / de Economía y Competitividad por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado tras la concesión de una beca FPI (BES-2011-047887) y a los fondos europeos (FEDER), estatales y autonómicos (Xunta de Galicia) por la financiación recibida a través de los proyectos CTQ2009-08377, CTQ2012-33080, 10MDS700006PR, DE2009-0020, CTM2011-28765-Co2-02, CTM2014-56628-C3-2-R y GRC2013-020. Extender mi gratitud a la fundación Manuel Ventura Figueroa por la concesión de una bolsa para los estudios mencionados anteriormente.

Al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y al Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, en especial a Rafael Cela y al Grupo de Cromatografía y Quimiometría por acogerme durante estos años y por aportar los medios necesarios para la realización de la presente Tesis Doctoral.

I would like to extend my gratitude to Monika and all her team for giving me the opportunity to work hand in hand with them in the Department of the Helmholtz Centre for Environmental Research (Leipzig). Also grateful to Ed and the members of the Environment Canada Center (Burlington), Stuart, Mohamed and their team of the Department of Geography, Earth and Environmental Sciences (Birmingham), and finally to Chiara and her colleagues of the Department of

Chemical Sciences and Pharmacology (Ferrara). Thanks a lot to all of you for your warm welcomes, your hospitality, your unconditional support and your sweet farewells... you made me feel like home.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, tanto a los de “casa” como a aquellos que conocí durante mis breves estancias en el extranjero; todos y cada uno de vosotros habéis dejado huella y será difícil olvidaros. Aún recuerdo los primeros pasos por la facultad compartidos con algunas de las que, más adelante, se convertirían en grandes amistades; hemos estado ahí día a día y pese a la distancia no dudo que seguirá siendo así durante muchos años más. Otros, sin embargo, fuisteis entrando en mi vida con posterioridad y no por ello con menor intensidad; en algunos, sé que encontré grandes compañeros y mejores amigos. Lo mismo ha sucedido con las nuevas amistades forjadas en los diferentes viajes, sin duda las estancias cambian de color con personas como vosotras de las que me quedarán siempre buenos recuerdos. Difícil es mencionaros a todos pero, de verdad, gracias por estar ahí y hacer mucho más amenos y divertidos estos años de investigación.

Sin embargo, el gracias de mayor envergadura se lo dedico a mis padres y hermanas. Siempre han estado ahí, apoyándome en los buenos y no tan buenos momentos, dándome ánimos cuando parecía que las cosas no querían salir más que al revés; sin ellos y sin su apoyo incondicional quizá hoy no me encontraría escribiendo estas líneas. Me puedo hacer una idea de cómo se sentirán el día en el que defienda la presente memoria; sin embargo, el sentimiento no va a ser mayor que el que siento yo por ellos cada día.

Por último, agradecer a mi pareja el apoyo y la comprensión que me ha demostrado a lo largo de todo este tiempo, sobre todo la paciencia, que en estos casos os informo, es muy necesaria. Gracias también al resto de mi familia; siempre están ahí, alentándome e interesándose no sólo por los avances de esta memoria, sino por todas las facetas de mi vida... como sabéis somos una pña!!

MUCHÍSIMAS GRACIAS



ÍNDICE



SUMMARY	1
1. AIMS	3
2. INTRODUCTION	4
3. RESEARCH ACTIVITIES AND RESULTS	9
4. REFERENCES	16
 I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	 21
 II. INTRODUCCIÓN	 25
1. COMPUESTOS DE INTERÉS	27
1.1 PARABENES Y TRICLOSÁN	27
1.1.1 Definición y aplicaciones	27
1.1.2 Estructura y propiedades.....	28
1.1.3 Toxicidad.....	31
1.1.4 Legislación	34
1.1.5 Interés medioambiental	36
1.2 ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS	48
1.2.1 Definición y aplicaciones	48
1.2.2 Estructura y propiedades.....	50
1.2.3 Toxicidad.....	52
1.2.4 Legislación	54
1.2.5 Interés medioambiental	56
1.3 RETARDANTES DE LLAMA	66
1.3.1 Definición y aplicaciones	66
1.3.2 Estructura y propiedades.....	69
1.3.3 Toxicidad.....	72
1.3.4 Legislación	74
1.3.5 Interés medioambiental	75

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	86
2.1 MATRICES ACUOSAS: AGUAS	87
2.1.1 Extracción líquido-líquido (Liquid-liquid extraction, LLE).....	87
2.1.2 Extracción en fase sólida (Solid-phase extraction, SPE)	88
2.1.3 Técnicas de microextracción	105
2.2 MATRICES SÓLIDAS: MOLUSCOS Y PESCADOS.....	131
2.2.1 Soxhlet	131
2.2.2 Digestión alcalina	133
2.2.3 Extracción asistida por ultrasonidos (Ultrasound assisted extraction, UAE)	134
2.2.4 Extracción asistida con fluidos supercríticos (Supercritical fluid extraction, SFE)	135
2.2.5 Extracción asistida con microondas (Microwave assisted extraction, MAE)	136
2.2.6 Extracción con líquidos presurizados (Pressurized liquid extraction, PLE)	137
2.2.7 Dispersión de la matriz en fase sólida (Matrix solid-phase dispersion, MSPD)	138
3. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN	147
3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	147
3.1.1 Derivatización	148
3.1.2 Sistemas de inyección	151
3.1.3 Sistemas de detección: acoplamiento a espectrometría de masas (MS)	151
3.1.4 Aplicación de GC-MS a la determinación de los compuestos de interés en muestras ambientales.	157
3.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	165
3.2.1 Sistemas de detección: acoplamiento a espectrometría de masas	166
3.2.2 Aplicación de LC-MS a la determinación de los compuestos de interés en muestras ambientales	167
III. EXPERIMENTAL	175
1. PATRONES, REACTIVOS, MATERIAL Y MUESTRAS EMPLEADAS	177
1.1 PATRONES	177

1.1.1	Parabenos y triclosán.....	177
1.1.2	Ácidos perfluoroalquilados.....	177
1.1.3	Retardantes de llama.....	177
1.2	DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES	178
1.3	MATERIAL GENERAL	179
1.4	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	181
1.4.1	Parabenos y triclosán.....	181
1.4.2	Ácidos perfluoroalquilados.....	182
1.4.3	Retardantes de llama.....	182
1.5	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	183
1.5.1	Muestras acuosas	183
1.5.2	Muestras sólidas (moluscos)	186
2.	MÉTODOS INSTRUMENTALES: EQUIPOS, CONDICIONES INSTRUMENTALES Y MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	188
2.1	PARABENOS Y TRICLOSÁN.....	188
2.1.1	Análisis de muestras de aguas.....	188
2.1.2	Análisis de muestras de moluscos.....	190
2.2	ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS	193
2.3	RETARDANTES DE LLAMA	196
3.	PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN OPTIMIZADOS	200
3.1	EXTRACCIÓN DE PARABENOS Y TRICLOSÁN MEDIANTE MASE	200
3.2	EXTRACCIÓN DE PARABENOS Y TRICLOSÁN MEDIANTE MSPD	202
3.3	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE EXTRACCIÓN CON ADSORBENTES POLIMÉRICOS DE BAJO COSTE	204
3.4	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE SPE	206
3.5	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE MSPD	208
3.6	EXTRACCIÓN DE RETARDANTES DE LLAMA MEDIANTE EXTRACCIÓN CON ABSORBENTES POLIMÉRICOS DE BAJO COSTE	210
3.7	EXTRACCIÓN DE RETARDANTES DE LLAMA MEDIANTE MSPD	212

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	215
1. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN	217
1.1 PARABENES MEDIANTE LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).....	217
1.1.1 Cromatogramas	217
1.1.2 Linealidad	218
1.1.3 Precisión.....	219
1.1.4 LODs, LOQs y blancos instrumentales.....	220
1.2 ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	220
1.2.1 Cromatogramas	220
1.2.2 Linealidad	222
1.2.3 Precisión.....	223
1.2.4 LODs, LOQs y blancos instrumentales.....	223
1.3 RETARDANTES DE LLAMA MEDIANTE GC-(NCI)-MS(Q).....	224
1.3.1 Cromatogramas	224
1.3.2 Linealidad	225
1.3.3 Precisión.....	225
1.3.4 LODs, LOQs y blancos instrumentales.....	228
2. DESARROLLO METODOLÓGICO	229
2.1 DETERMINACIÓN DE PARABENES Y TRICLOSÁN EN AGUAS MEDIANTE MASE	229
2.1.1 Introducción y objetivos	229
2.1.2 Optimización de la técnica de extracción	230
2.1.3 Caracterización analítica del método.....	243
2.1.4 Aplicación a muestras reales	248
2.2 DETERMINACIÓN DE PARABENES EN MOLUSCOS MEDIANTE MSPD	251
2.2.1 Introducción y objetivos	251
2.2.2 Optimización de la técnica de extracción	252
2.2.3 Caracterización analítica del método.....	260
2.2.4 Aplicación a muestras reales	265

2.3	DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS EN AGUAS MEDIANTE AD/ABSORBENTES POLIMÉRICOS	269
2.3.1	Introducción y objetivos	269
2.3.2	Optimización de la técnica de extracción	270
2.3.3	Caracterización analítica del método	280
2.3.4	Aplicación a muestras reales	289
2.4	DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS EN AGUAS MEDIANTE SPE.....	291
2.4.1	Introducción y objetivos	291
2.4.2	Optimización de la técnica de extracción	292
2.4.3	Caracterización analítica del método	300
2.4.4	Aplicación a amuestras reales	306
2.5	DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS EN MOLUSCOS MEDIANTE MSPD	309
2.5.1	Introducción y objetivos	309
2.5.2	Optimización de la técnica de extracción	310
2.5.3	Caracterización analítica del método	319
2.5.4	Aplicación a muestras reales	323
2.6	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS RETARDANTES DE LLAMA EN AGUAS MEDIANTE AD/ABSORBENTES POLIMÉRICOS.....	327
2.6.1	Introducción y objetivos	327
2.6.2	Optimización de la técnica de extracción	328
2.6.3	Caracterización analítica del método	340
2.6.4	Aplicación a muestras reales	346
2.7	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS RETARDANTES DE LLAMA EN MOLUSCOS MEDIANTE MSPD	349
2.7.1	Introducción y objetivos	349
2.7.2	Optimización de la técnica de extracción	350
2.7.3	Caracterización analítica del método	358
2.7.4	Aplicación a muestras reales	364

V. CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS	367
1. CONCLUSIONES	369
1.1 CONCLUSIONES PARA MUESTRAS ACUOSAS	369
1.2 CONCLUSIONES PARA MATRICES DE MOLUSCOS	373
2. CONCLUSIONS	375
2.1 CONCLUSIONS FOR AQUEOUS MATRICES	375
2.2 CONCLUSIONS FOR MOLLUSKS SAMPLES	378
 VI. REFERENCIAS / REFERENCES	 381
 ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ECUACIONES	 413
 SIGLAS Y ACRÓNIMOS / ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	 425
 ANEXOS	 435
1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	437
2. OTRAS PUBLICACIONES	438



SUMMARY



This section introduces a small summary of the PhD dissertation. It is divided in three parts: the first one presents a brief explanation about the main aims and objectives considered in this research, the second one offers a small introduction about the studied pollutants and the extraction techniques, and the last one the most relevant results and conclusions of each developed studies. More exhaustive conclusions are presented in Chapter V.

1. AIMS

During last decades, numerous chemicals from domestic and industrial activities were discharged into the environment leading to an increased pollution of wildlife. Nowadays, the discharges should pass through wastewater treatment plants (WWTP), however a complete removal of the contaminants is not always achieved [1], originating, even in some cases, more harmful degradation products, or an indiscriminate distribution of the precursors into the different environmental compartments. Rivers and seas are the principal receptors of these uncompleted treated waters; however, depending on the physico-chemical characteristics of the compounds, fishes, mollusks and the rest of fauna could also be an important sink. Thus, this PhD dissertation is focused on the development of new methodologies for the extraction and determination of several families of pollutants, including parabens, triclosan, perfluoroalkylated substances (PFASs) and some flame retardants (FRs), from aqueous and mollusks samples from the Galician environment. To this end, several extraction techniques were considered based on their effectivity, simplicity and economy. The general aims of the present work were:

1. Optimization and validation of the different extraction techniques for the determination of the selected analytes in aqueous samples, such as, river, sea, ria and wastewaters, and in mollusk samples, such as mussels, cockles and clams, most of them collected on the Galician coast.
2. To apply the developed methodology to real samples in order to obtain some preliminary information about their presence and distribution in Galicia and their environmental concentration.

2. INTRODUCTION

1.1 PARABENS AND TRICLOSAN

Parabens (esters of 4-hydroxybenzoic acid) and triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol) are employed as bactericides in the formulation of personal care products (PCPs) [2]. Triclosan is also incorporated as a biocide in sportive clothes, footwear, carpets, plastic toys and kitchenware, and parabens as preservatives in pharmaceuticals and food products [3]. There are seven types of parabens in use differing in the ester group, i.e. methyl- (MeP), ethyl- (EtP), *n*-propyl- (*n*-PrP), *iso*-propyl- (*i*-PrP), *n*-butyl- (*n*-BuP), *iso*-butyl- (*i*-BuP) and benzyl- (BzP) paraben [2]. Among them, MeP and *n*-PrP are the most widely used in cosmetics, and are typically co-applied to increase preservative effects [3]. In European Union (EU) countries, the maximum allowable concentrations of parabens in cosmetic products are 0.4 % for each single ester and 0.8 % for mixtures of parabens [4], and 0.3 % for triclosan [5].

Although for most of them ecotoxicological data is still scarce, nowadays, it is known that all these compounds are weak endocrine disruptors [6]. In general, acute and chronic (eco)toxicity of parabens increases in the following order: MeP<EtP<PrP<BuP<BzP [7-9]. Recent studies have suggested a possible relationship between breast cancer and prolonged dermal expositions to paraben-containing products [10]. Moreover, at concentrations as low as those found in tap water, chlorine can react with parabens to produce chlorinated derivatives [11] which are considerably more toxic to aquatic organisms than the parent compounds [6]. The main concern about triclosan is that it can turn into more toxic and persistent species such as chlorinated phenols, polychlorinated biphenyl ethers and polychlorinated dibenzodioxins [12].

As in the case of other chemicals used in PCP formulation, triclosan and parabens are continuously released into the environment through domestic and industrial wastewater and, although most of them (particularly parabens) are completely removed in conventional WWTP [13], they have been detected in river water [14]. Parabens, as all PCPs, are products intended for external use on human body and thus are not subjected to metabolic alterations. Therefore, large quantities of them enter in the environment unaltered through regular usage, and recent studies have indicated that many are environmentally persistent, bioactive, and have the potential for bioaccumulation [3,15]. Thus, parabens were detected in several matrices throughout the world, such as surface and drinking water, sediments and soils, and biota. Chlorinated derivatives of parabens

have also been found in some environmental matrices, such as wastewater [16] and sludge [17], but data about the presence of these chlorinated transformation products in environmental samples is still scarce and the occurrence in biota samples has not been investigated yet.

Analytical methods for the determination of these compounds in water samples are based on a pre-concentration step, usually solid-phase extraction (SPE) followed by subsequent determination by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [18] or liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [14,19]. Common pre-concentration techniques, such as SPE, are time, solvent and labour consuming. Recently, much effort has been focused on the development of pre-concentration procedures for the determination of parabens and triclosan, which reduce solvent consumption, time and labour effort, such as solid-phase microextraction (SPME) [20], single-drop microextraction (SDME) [21] or ultrasound-assisted emulsification-microextraction (USAEME) [22].

Until the moment when this work began, no analytical method had been developed for mollusks, while analytical procedures applied to the determination of parabens in fish samples were based on accelerated solvent extraction (ASE) [23], high speed solvent extraction (HSSE) [24] or sonication [25]. Nevertheless, extracts from such complex fish matrix also require an additional clean-up step, since they produce high lipid content extracts which may interfere with chromatographic analysis. The most often applied purification steps includes SPE using a silica column [23] or gel permeation chromatography (GPC) [23]. Alternatively, matrix solid-phase extraction (MSPD) has been successfully applied to the determination of parabens in sewage sludge [17] and dust [26] samples. MSPD requires less sample intake and solvent consumption and incorporates the extraction and clean-up in a single step with a notable simplification of the process, as shown by some previous applications to fish/mollusks analysis in the literature [27,28].

Regarding GC-MS determination, these compounds are often derivatized to improve sensitivity, peak separation and peak symmetry. Silylation has been applied to the derivatization of parabens and triclosan, mainly using *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MTBSTFA) as a derivatization reagent in organic media [29]. Moreover, acylation with acetic anhydride (Ac₂O) has been applied to their derivatization in aqueous samples [30].

1.2 PERFLUOROALKYLATED SUBSTANCES

PFASs are a group of chemical widely distributed in the environment throughout the last 40 years due to their numerous industrial and commercial applications, such as textile, carpet and leather treatment, surfactants, fire-fighting foams and grease-proofing treatments [31,32]. PFASs are constituted by a hydrophobic alkyl chain of varying length (normally C4 to C16) which is fully fluorinated and a hydrophilic functional end group. Based on this functional end group, PFASs can be divided into several families, the two main ones being perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs) and perfluoroalkyl sulfonates (PFSA)s [33].

Due to the high electronegativity of fluorine, covalent bonds between carbon and fluorine are very strong, conferring PFASs a high resistance towards acid and alkaline hydrolysis, photolysis, biodegradation and metabolism, which confer them high environmental persistence causing relevant bioaccumulation problems in several organisms [31]. As a consequence of their widespread use and their resulting emissions, PFASs were detected in several environmental compartments, like different types of waters, sediments and soils, air or biota; normally at concentrations at the ng L^{-1} or ng g^{-1} level [34].

Among PFASs, perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) are the two most commonly detected. Both were considered biologically inactive during the decade of 50s, but subsequent studies have found toxic effects in liver, immune system and reproduction organs in animals. PFOA and PFOS affect homeostatic sexuality hormones and are associated with an increase in fetal resorptions and abortions in animals. They also affect neuroendocrine system of rodents, causing hepatocellular hypertrophy and the increment of cholesterol and triglycerides in rats [35,36].

Concerns about the potential environmental and toxicological impact of long-chain PFASs have led, among other initiatives, to: (1) the inclusion of PFOS in the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants as an Annex B substance, i.e. restricted in its use; (2) an EU Marketing and Use Directive restricting the use of “perfluorooctane sunfonates” in the EU; and (3) a stewardship agreement between the United States of America Environmental Protection Agency (US EPA) and eight leading global companies to reduce emissions and product content of PFOA and related chemicals by 95 % by 2010 and to work toward their elimination by 2015 [37]. In addition, the European Food Safety Authority (EFSA) establishes human tolerable daily intake on 150 ng kg^{-1} body weight for PFOS and $1,500 \text{ ng kg}^{-1}$ body weight, for PFOA [38]. Moreover, PFOS has been recently included by the EU in the list of priority hazardous substances in the field of water policy, establishing environmental quality standard levels of annual average concentration (for

inland surface waters of 0.65 ng L^{-1} and for other surface waters of 0.13 ng L^{-1}) and maximum allowable concentrations (for inland surface waters $36 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and for other surface waters $7.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) [39].

Due to the current interest on PFASs, several sample preparation methods have been developed for their determination in environment [40]. In the case of water samples, liquid-liquid extraction (LLE) and SPE with different sorbents materials, such as C_{18} , Oasis® WAX or HLB, followed by solvent evaporation are the traditional methods used for enrichment and isolation of trace levels of PFASs from surface water and wastewater. In this SPE context, ISO standard 25101 recommends the use of Oasis® WAX cartridges. In the particular case of sea water samples, SPE protocols applied are the same as those developed and validated for ultrapure or fresh water without previous re-evaluation and validation for this particular matrix. Most of the methods are based on the protocol developed by Taniyasu et al. [41]. Moreover, when very low (pg L^{-1}) limits of detection (LODs) are required, SPE procedures have been modified by increasing sample volumes up to 30 L [42,43]. However, over the years, some more recent and innovative techniques, which lower the consumption of organic solvents, have also been applied for PFASs extraction, as e.g. SPME [44], stir-bar sorptive extraction (SBSE) or better off the use of disposable low cost polymeric materials, which do not need to be reused, avoiding cross-contamination problems. In this case, polydimethylsiloxane (PDMS) has been the most frequently used sorbent [45]. Yet, in a recent work, we have shown that polyethersulfone (PES), may represent a more efficient alternative, particularly for polar analytes [46].

Among solid-matrixes extraction techniques, alkaline digestion [47,48], acid digestion, ion-pair extraction [47,48], solvent extraction, and ASE are the most commonly reported analytical methods for the extraction of these compounds from mollusk and fish samples. However, in order to avoid the presence of lipids in the extracts, extending column life and improving LODs and limits of quantification (LOQs), a clean-up step after sample extraction is required in many cases, mostly by SPE [49,50].

As regards separation and detection, the most frequently used technique is LC-MS or LC-MS/MS [41,51]. GC is less frequently used because it needs a derivatization step prior to analysis and some of the analytes of interest cannot generate stable and volatile derivative compounds, as e.g. PFOS.

1.3 FLAME RETARDANTS

FRs are a group of chemicals used in many products, such as textiles, paints, thermoplastics and foams, in order to delay and inhibit the occurrence of fire and combustion processes. Among the several classes of FRs, brominated flame retardants (BFRs) are the more widely used [52]. The most frequently used and studied BFRs are polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane stereoisomers. PBDEs consist of 209 individual molecules whose combinations in different percentages constitute commercial technical mixtures: penta-BDE mix (mostly penta- and tetra-BDE congeners) used in polyurethane foam and in adhesives; octa-BDE mix (mostly hepta- and octa-BDE congeners) used in hard plastics and deca-BDE mix (mostly BDE-209 with some nona- and octa-BDE congeners) used in plastics such as high impact polystyrene in electrical and electronic equipment [53]. However, penta- and octa-mixtures were banned for use in all applications by the EU in 2003 [54], and according to the EU directive on the “restriction of use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment” [55], manufacturers must substitute PBDEs in new equipment. Deca-BDE was exempted from the directive until 2008 when European Courts of justice overturned it [56]. Furthermore, in May 2009, penta- and octa-BDEs were included in the priority list established by the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.

Due to these recent legislative actions, it was necessary to introduce alternative novel FRs (NFRs) in the market. Those NFRs were mainly created for replacing the different PBDE mixtures. Hence, 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabromobenzoate (EHTBB) and bis(2-ethylhexyl)-3,4,5,6-tetrabromo-phthalate (DEHTBP) are used in replacement of penta-BDE, 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane (BTBPE) as a substitute of octa-BDE and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in replacement of deca-BDE [57]. Dechlorane plus (DP) can also be included in the term NFRs because, despite being a chlorinated FR used for over 40 years [58], it has been only recently studied and determined in environment and biota samples [59,60].

Due to the intrinsic characteristics of halogenated FRs (HFRs), including low volatility, hydrophobicity, and, consequently, high affinity for lipids, it is common to find them at relatively elevated amounts in biota [61], although can also be detected in biological samples, air and dust, sediments and sewage sludge, however, few investigations have reported the presence of this compounds in aqueous samples [62]. Recent studies oriented toward the determination of NFRs and PBDEs in marine biota all over the world [63-65] have shown that these chemicals typically occur at the ng g^{-1} concentration level. Moreover, recent publications have shown that, besides PBDEs, some of these NFRs may

also cause cancer, such as DBDPE [66] and DEHTBP [58], and endocrine effects, e.g. DBDPE and BTBPE [67]. Therefore, it is important to have reliable analytical tools for the study of a wide set of HFRs in biota.

Determination of these compounds in water samples was achieved using SPE as extraction procedure [68]. However, in order to reduce sample manipulation and organic solvent consumption other alternatives as SPME [69] and SBSE [70] were also used, but only for some PBDEs. In this content, the sorptive capacity of Twisters is higher than SPME fibers, since a larger volume of sorbent is employed. However, other non-commercial (for analytical purposes) devices based on bulk materials, such as PDMS rods or PES tubes, present the same advantages of SBSE in terms of low price in comparison with SPME fibers or Twisters. Therefore, they can be used as disposable devices [45], and attractive feature when determining hydrophobic analytes, such as PBDEs and other FRs, since carry-over problems can be easily avoided. To the date the experimental work of this Thesis began, disposable PDMS rods have only been employed for the determination of the penta-BDE mixture using the headspace sampling mode [71]. However, neither application to the determination of octa- and deca-BDE mix, nor to other FRs had been reported yet.

The extraction techniques most frequently employed for the extraction of PBDEs and NFRs from mollusk and fish samples are ASE [72], Soxhlet extraction [64], and, to a minor extend, microwave assisted extraction (MAE) [73]. However, most of those methods were optimized for the extraction of PBDEs and then, simply used also for NFRs, which may in several cases compromise method recoveries and overall performance. After previous satisfactory results and the several advantages which MSPD provides, it will be considered as an important alternative to achieve the extraction of the studied FRs.

3. RESEARCH ACTIVITIES AND RESULTS

The present PhD dissertation includes seven different methodologies developed to achieve the extraction and determination of parabens, triclosan, PFASs and some HFRs from different waters and several mollusk samples. To this end, three different water-matrices extraction-techniques, such as, membrane-assisted solvent extraction (MASE), extraction with bulk sorbent materials (PES or PDMS) and SPE, and only one solid-matrices extraction-technique were considered (MSPD). This section summarizes the main results of each research.

DETERMINATION OF PARABENS AND TRICLOSAN IN WATER BY MASE AND GC-MS/MS

As mentioned previously, the main entry route of parabens and triclosan in the environment is through WWTP, which then discharges on rivers. Thus, this first study was focused on the development of a new methodology in order to achieve the determination of these pollutants in several water matrices, such as rivers and wastewater (effluent and influent). To this end, MASE and GC-MS/MS were selected as extraction and determination techniques.

Due to the high polarity of parabens the selection of a derivatization agent was required. Several combinations between derivatization reagents (MTBSTFA, isobutylchloroformate (*i*BCF) and Ac_2O) and basic catalyzer agents were considered, providing Ac_2O and K_2HPO_4 the best analytical results. Under optimized extraction conditions, parabens and triclosan were extracted from 18 mL of sample performing an in-sample acetylation with 0.2 g of K_2HPO_4 and 200 μL of Ac_2O at 500 rpm for 8 min at 35 °C. Analytes extraction was achieved by introducing 400 μL of chloroform in the membrane. Finally, the organic phase was withdrawn from the membrane and injected in the programmed temperature vaporizer (PTV)-GC-MS/MS system. Although analytes extraction requires 90 min, this is not an inconvenient taking into account the possibility of performing several samples simultaneously. Further, this is not the only advantage of MASE, as it also allows reducing the global price of the method, since the cost of these lab-made membranes is about 1 € for 1,000 membranes, so they can be considered as inexpensive disposable devices, eliminating the risk of cross-contamination problems.

Finally, the method was validated with real samples, showing a good performance providing excellent responses (determination coefficient (R^2) > 0.993, relative standard deviation (RSD) < 8.3 %, relative recoveries from 83 to 101 % and LODs < 1.4 ng L⁻¹). Its application to the analysis of surface water and wastewater samples, showed levels up to 26 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MeP in raw wastewater.

DETERMINATION OF PARABENS IN MOLLUSKS BY MSPD AND LC-MS/MS

Despite the high polarity and their propensity to be found in aqueous media, parabens were detected in biota samples. However, most developed methods require a clean-up step after the extraction of the analytes. Thus, MSPD was considered as an alternative to perform the extraction of parabens from biota samples. So, in this second

study, a method based on MSPD extraction followed by LC-MS/MS system was developed to determine the presence of these compounds in mollusk samples (cockles, mussels and clams).

The optimization of the procedure was done by selecting different parameters which typically affect the MSPD, such as type of solid support, clean-up sorbent or solvent, and their respective amounts. The selection of the best materials was done based on a compromise between minimization of dry residue amount in extracts and a high recovery percentage. A Box-Behnken experimental design composed by 16 experiments was applied to optimize the respective amounts. Optimized extraction was performed dispersing 0.5 g of sample with 1.2 g of silica, placing 4 g of C₁₈ used as sorbent into an empty polypropylene syringe and using 10 mL of acetonitrile as solvent extraction. A previous clean-up stage of silica and C₁₈ with acetonitrile was necessary to minimize the blank content of some analytes, mainly MeP and *n*-PrP. MSPD has demonstrated to be an excellent alternative to the most classical extraction techniques, offering the possibility of perform extraction and clean-up in a single step.

Validation of the method afforded successful results ($R^2 > 0.999$ %, RSD < 21 %, recoveries from 71 to 117 % (except for Cl₂MeP), LODs < 0.43 ng g⁻¹ dry weight (dw)). MeP and EtP were detected in most of the analyzed samples up to 7 ng g⁻¹ dw of MeP in raft cultured mussels.

DETERMINATION OF PFASs IN WATER SAMPLES BY PES EXTRACTION AND LC-MS/MS

This work evaluated polymeric materials as low cost bulk sorbent extractants based on the satisfactory results obtained with some of them in previous studies. In this case, a polymeric sorbent (PES) extraction followed by LC-MS/MS was selected to achieve the determination of some PFASs in several water sample types (influent, river, ria and sea water).

Several variables were optimized, such as sample pH, concentration of an ion-pairing agent (tetrabutylammonium (TBA)), ionic strength, sample volume, extraction time, desorption solvent volume, desorption time and the need for auxiliary desorption techniques (sonication). According to the results, PES leaded to a better sensitivity than PDMS, particularly for most polar analytes (C6 - C9), reaching LODs in the 0.2 - 20 ng L⁻¹ range. This methodology proved to be an excellent alternative to other extraction

techniques, providing numerous advantages such as small volume of solvent, possibility to perform several simultaneous extraction, extreme simplicity of the procedure and the low overall cost.

The developed methodology was validated ($R^2 > 0.98$ %, $RSD < 16$ %, extraction efficiencies up to 73.8 % and relative recoveries from 85 to 108 %) and applied to the determination of eight PFASs from different kinds of aqueous samples, demonstrating the wide distribution of PFASs in Galician environment, finding maximum levels up to 401 ng L⁻¹ for perfluoroheptanoic acid in wastewater.

DETERMINATION OF PFASs IN WATER BY SPE AND LC-MS/MS

This investigation emerged as an alternative to PES extraction after the publication of the recent Water Frame Directive [39]. This EU directive established new environmental quality standard levels for inland and other surface water samples for PFOS below the LODs achieved with PES extraction. Thus, an extraction technique was required to achieve these new LODs below those levels proposed by this new EU directive. Such alternative was based on SPE followed by LC-MS/MS targeted to the determination of PFASs in different water samples (river and sea water).

To that date, the developed methodologies based on SPE, apply indifferently the same protocol optimized for fresh water to high salinity water. However, this study has demonstrated the importance of the salinity in the SPEs protocol. Oasis® WAX and Oasis® HLB are the most common sorbents used, but, Oasis® WAX, when using pure methanol for clean-up leads to poor recoveries, which was found to be due to incomplete retention by the ion-exchange mechanism that works in fresh water but not with marine samples. Although a clean-up with a 75 % of methanol in water was used its results are not better than those obtained with Oasis® HLB cartridges. Validation of the methodology with optimized Oasis® HLB cartridges produced recoveries higher than 71 %, RSDs lower than 20 % and LODs between 0.01 to 0.21 ng L⁻¹, which allows the detection of PFOS at those levels established in the EU directive [39].

The application of the developed method to real samples show the ubiquity of this family of analytes, PFOS reaching concentration levels up to 64 ng L⁻¹.

DETERMINATION OF PFASs IN MOLLUSKS BY MSPD AND LC-MS/MS

As for the previous family of pollutants, despite the relative polarity of PFASs they were detected in several occasions in biota samples. Thus, this work was focused on the development of a new methodology to determine the presence of these compounds in mollusk samples using MSPD and LC-MS/MS as extraction technique and detection system, respectively.

MSPD was also chosen to perform this research based of the several advantages previously mentioned. Some parameters such as dispersing agent, clean-up sorbent and solvent were analyzed and optimized. A Doehlert design which enables a different number of levels for each of the factors was selected to optimize the level of each parameter. In the final method, 0.5 g of sample were dispersed with 0.2 g of diatomaceous earth and transferred into a polypropylene syringe containing 4 g of silica as clean-up sorbent. Then the analytes are eluted with 20 mL of acetonitrile. The extract was finally concentrated to a final volume of 0.5 mL in methanol, avoiding extract dryness in order to prevent evaporation losses, and injected in the LC-MS/MS system.

The method was validated and finally applied to different real mollusk samples, such as mussels, cockles and clams. The combination of this MSPD protocol with LC-MS/MS afforded LODs from 0.05 to 0.3 ng g⁻¹ dw. The recovery of the method was evaluated with the three types of spiked mollusks samples achieving values between 64 to 126 %. Furthermore, a comparison between the optimized MSPD protocol and a reference method (ion-pair extraction) was done with a spiked and aged (1 month) mussel sample, producing both methods statistically equal concentration values. Concentration results from real samples reveal the wide distribution of these analytes, with up to 8.3 ng g⁻¹ dw for PFOA. Moreover, although it is not the same type of sample, it is important to highlight that PFOS values found in the samples were lower than the limits established in the Water Frame Directive [39] (9.1 ng g⁻¹ wet weight (ww) for biota), as an indicator of water quality.

DETERMINATION OF FRs IN WATER BY PDMS EXTRACTION AND GC-MS

The presence and distribution of FRs was also investigated, again in aqueous and biota samples from the Galician environment. As compared to the previous families of compounds, FRs are by far the most hydrophobic analytes, which implies a lower probability of detection in aqueous media and lower expected concentrations. Moreover,

SUMMARY

after the satisfactory results obtained with polymeric devices, this study focused its research in the development of a methodology based on polymeric extractants to achieve the determination of nine PBDEs and six NFRs in water samples, using GC-MS with negative chemical ionization (NCI) as separation and detection system.

In this case, PES and PDMS were also evaluated; however, being FRs less polar than PFASs, better extraction efficiencies were achieved with the PDMS material. During the present study several parameters were evaluated, such as desorption solvent, desorption time, desorption solvent volume, the presence of an organic modifier (methanol), ionic strength and extraction time. The final optimized protocol consists on an overnight extraction of 100 mL of sample (40 % methanol and 4 % NaCl), followed by a 15-min sonication-assisted desorption with 300 μ L of ethyl acetate, solvent evaporation and GC-NCI-MS analysis. Centrifugation and filtration procedures were avoided as pretreatment, led to a significant reduction of analytes concentration, due to adsorption.

The developed method was validated, providing extraction efficiencies in the 9 to 70 % range, leading to enrichment factors up to 840, LODs between 0.4 to 10 ng L⁻¹, RSD lower to 23 % and relative recoveries in the range of 70 to 130 % (except DBDPE). The application of the methodology to real water (ria, river, sea, effluent and influent) demonstrate the absence of these contaminants in aqueous matrices of Galicia, above the LODs.

DETERMINATION OF FRs IN MOLLUSKS BY MSPD AND GC-MS

As the last research in the present Thesis, a new biota-targeted determination-method was required, based on the tendency of FRs to accumulate in lipidic samples. Therefore, mollusks were considered as good candidates to determine their presence in the marine environment. Due to the high lipid content, MSPD was selected as a simple and effective clean-up-extraction technique, providing cleaner extracts and saving the life of the GC column. Thus, this study presents the development of a new analytical method for the simultaneous determination of nine PBDEs and six NFRs in different kinds of mollusk using MSPD followed by GC-NCI-MS. The proposed method is the first one developed for such a broad range of HFRs in aquatic biota.

As in previous MSPD works, solid support, clean-up sorbent and solvent types and amounts were studied, as to improve the recoveries and minimize the dry residue amounts

in extracts. Sorbent selection required a more exhaustive study to get cleaner extracts, where finally a combination of two sorbents, viz. Florisil and silica deactivated with 5 % and 10 % of water and sulfuric acid, respectively, provided cleaner extracts with a dry residue lower than 0.5 %. Under optimal conditions, 0.5 g of sample, 0.5 g of a primary-secondary amine (PSA) as a solid support, the previous sorbent combination, 0.5 g of silica activated (at the bottom of the syringe to remove the possible sulfuric traces) and 10 mL of dichloromethane, were used. Standard addition over the extract was required for the correct quantification due to matrix effects occurring with the GC system, particularly for NFRs.

Finally, validation and application to real samples was done. The new developed method generate recoveries between 70 and 120 % for the three studied mollusks (mussels, cockles and clams, except for DEHTBP in clams 46 %), and LODs in the range of 0.003 to 0.07 ng g⁻¹ dw (except for DBDPE 0.63 ng g⁻¹ dw). In contrast to water samples, FRs were detected in most mollusks, including NFRs, reaching levels up to 4 ng g⁻¹ dw for BDE-209 in raft cultured mussel.

4. REFERENCES

1. D.C. McAvoy, B. Schatowitz, M. Jacob, A. Hauk, W.S. Eckhoff, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 1323.
2. J.M. Brausch, G.M. Rand, *Chemosphere* 82 (2011) 1518.
3. A.M. Peck, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 907.
4. Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, *Official Journal of the European Union* L282, 26/09/2014, p. 5-8.
5. Commission Regulation (EU) No 358/2014 of 9 April 2014 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, *Official Journal of the European Union* L107, 10/04/2014, p. 5-9.
6. M. Terasaki, M. Makino, N. Tatarazako, *J. Appl. Toxicol.* 29 (2009) 242.
7. I. Bazin, A. Gadal, E. Touraud, B. Roig, *Hydroxy benzoate preservatives (parabens) in the environment: data for environmental toxicity assessment*, in: *Xenobiotics in the urban water cycle: mass flows, environmental processes, migration and treatment strategies*, chapter 14, D. Fatta-Kassinos, K. Bester, K. Kummerer (Eds.), Springer, Netherlands, 2010, p. 245.
8. H. Yamamoto, I. Tamura, Y. Hirata, J. Kato, K. Kagota, S. Katsuki, A. Yamamoto, Y. Kagami, N. Tatarazako, *Sci. Total Environ.* 410-411 (2011) 102.
9. L.L. Dobbins, S. Usenko, R.A. Brain, B.W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2744.
10. P.D. Darbre, A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, G.S. Pope, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 5.
11. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, N. Negreira, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 106.
12. K.L. Rule, V.R. Ebbett, P.J. Vikesland, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3176.
13. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 3.
14. I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1756.
15. D. Mackay, L. Barnhouse, *Integr. Environ. Assess. Manage.* 6 (2010) 390.
16. I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *Water Res.* 45 (2011) 6770.
17. B. Albero, R.A. Pérez, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. Hazard. Mater.* 239-240 (2012) 48.
18. H.-B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 122.
19. M. Pedrouzo, F. Borrell, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6994.
20. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 107.
21. M. Saraji, S. Mirmahdih, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 988.
22. J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J.C. García-Monteagudo, C. García-Jares, *Talanta* 79 (2009) 1387.
23. P. Emnet, S. Gaw, G. Northcott, B. Storey, L. Graham, *Environ. Res.* 136 (2015) 331.
24. B.R. Ramaswamy, J.-W. Kim, T. Isobe, K.-H. Chang, A. Amano, T.W. Miller, F.P. Siringan, S. Tanabe, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 1739.

25. M.A. Mottaleb, S. Usenko, J.G. O'Donnell, A.J. Ramirez, B.W. Brooks, C.K. Chambliss, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 815.
26. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Anal. Chem. 79 (2007) 1675.
27. E. Villaverde-de-Sáa, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Ferrero-Refojos, E. Rubí, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 509.
28. E. Villaverde-de-Sáa, C. Valls-Cantenys, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, J. Chromatogr. A 1300 (2013) 85.
29. R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 205.
30. J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4693.
31. E. Kissa, *Fluorinated Surfactants: Synthesis, Properties and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1994.
32. E. Kissa, *Fluorinated Surfactants and Repellents*, Marcel Dekker, Vol. 1, 2nd Edition, Revised and Expanded, New York, 2001.
33. R.C. Buck, J. Franklin, U. Berger, J.M. Conder, I.T. Cousins, P. de Voogt, A.A. Jensen, K. Kannan, S.A. Mabury, S.P.J. van Leeuwen, Integr. Environ. Assess. Manage. 7 (2011) 513.
34. L. Ahrens, J. Environ. Monit. 13 (2011) 20.
35. J.L. Butenhoff, G.L. Kennedy, S.R. Frame, J.C. O'Connor, R.G. York, Toxicology 196 (2004) 95.
36. C. Lau, K. Anitole, C. Hodes, D. Lai, A. Pfahles-Hutchens, J. Seed, Toxicol. Sci. 99 (2007) 366.
37. US EPA, 2006. 2010/2015 PFOA Stewardship Program. <http://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/20102015-pfoa-stewardship-program> (accessed 08/09/2016).
38. The EFSA Journal 653 (2008) 1-131.
39. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, Official Journal of the European Union L226/1, 24/08/2013, p. 1-17.
40. A. Jahnke, U. Berger, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 410.
41. S. Taniyasu, K. Kannan, M.K. So, A. Gulkowska, E. Sinclair, T. Okazawa, N. Yamashita, J. Chromatogr. A 1093 (2005) 89.
42. N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, T. Okazawa, G. Petrick, T. Gamo, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 5522.
43. N. Theobald, W. Gerwinski, C. Caliebe, M. Haarich, *Development and validation of a method for the determination of polyfluorinated organic substances in sea water, sediments and biota. Occurrence of these compounds in the North and Baltic seas*, Scientific report 202 22 213 of the German Federal Environmental Agency UBA-FB 00 001049, Vol. 625, <http://www.umweltbundesamt.de>, Dessau-Roßlau, 2007.
44. R. Alzaga, J.M. Bayona, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 155.
45. M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2589.
46. A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, Anal. Chim. Acta 716 (2012) 119.
47. M. Llorca, M. Farré, Y. Picó, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7195.
48. N. Quinete, Q. Wu, T. Zhang, S.H. Yun, I. Moreira, K. Kannan, Chemosphere 77 (2009) 863.

SUMMARY

49. Allsopp, M.; Santillo, D.; Walters, A.; Johnston, P.; Perfluorinated chemicals: an emerging concern; Technical note 04//2005, GRL-TN-04-2005, 45 pp.
50. L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 103.
51. K. Wille, J.V. Bussche, H. Noppe, E.D. Wulf, P.V. Caeter, C.R. Janssen, H.F.D. Brabander, L. Vanhaecke, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6616.
52. M. Harju, E.S. Heimstad, D. Herzke, T. Sandanger, S. Posner, F. Wania, Current state of knowledge and monitoring requirements - Emerging "new" brominated flame retardants in flame retarded products and the environment (TA-2462/2008), Norwegian Pollution Control Authority, Oslo 2008.
53. C.A. de Wit, D. Herzke, K. Vorkamp, Sci. Total Environ. 408 (2010) 2885.
54. Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether), Official Journal of the European Union L042, 15/02/2003, p. 45-46.
55. Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipments, Official Journal of the European Union L037, 13/02/2003, p. 19-23.
56. European Court of Justice, 2008. Judgment of the Court (Grand Chamber) of 1 April 2008 - European Parliament (C-14/06), Kingdom of Denmark (C-295/06) v Commission of the European Communities, Official Journal of the European Union C116, 09/05/2008, p. 2-3.
57. A. Covaci, S. Harrad, M.A.E. Abdallah, N. Ali, R.J. Law, D. Herzke, C.A. de Wit, Environ. Int. 37 (2011) 532.
58. Meeting of the California Environmental Biomonitoring Program (CECBP) 2008. Brominated and chlorinated organic chemical compounds used as flame retardants; Scientific Guidance Panel (SGP), <http://biomonitoring.ca.gov/sites/default/files/downloads/120408flamedoc.pdf> (accessed 16/09/2016).
59. L.T. Gauthier, C.E. Hebert, D.V.C. Weseloh, R.J. Letcher, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 4561.
60. E. Hoh, L. Zhu, R.A. Hites, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 1184.
61. T. Mørskeland, Environmental screening of selected "new" brominated flame retardants and selected polyfluorinated compounds 2009 (TA-2625/2010), Norwegian Climate and Pollution Agency, Høvic 2010.
62. Z. Xie, A. Moller, L. Ahrens, R. Sturm, R. Ebinghaus, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 1820.
63. I. Vives, J.O. Grimalt, S. Lacorte, M. Guillamón, D. Barceló, B.O. Rosseland, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 2338.
64. J. Hajslová, J. Pulkrabová, J. Poustka, T. Cajka, T. Randák, Chemosphere 69 (2007) 1195.
65. K. Law, T. Halldorson, R. Danell, G. Stern, S. Gewurtz, M. Alae, C. Marvin, M. Whittle, G. Tomy, Environ. Toxicol. Chem. 25 (2006) 2177.
66. TOXNET (2008). Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases, U.S. National Library of Medicine (NLM).
67. P. Koster, F.M.H. Debets, J.J.T.W.A. Strik, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 25 (1980) 313.

68. J. Cristale, J. Quintana, R. Chaler, F. Ventura, S. Lacorte, J. Chromatogr. A 1241 (2012) 1.
69. C. Salgado-Petinal, M. García-Chao, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 637.
70. A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 739.
71. R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 41.
72. C. Munschy, K. Heas-Moisán, C. Tixier, L. Boulesteix, J. Morin, Sci. Total Environ. 409 (2011) 4618.
73. W. Vetter, Anal. Chem. 73 (2001) 4951.







I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



A lo largo de las últimas décadas, ha tenido y sigue teniendo lugar una importante evolución tanto en el ámbito científico como en el tecnológico. Estos avances han permitido la generación de productos destinados a facilitar y mejorar nuestra calidad de vida. En paralelo a ello, se incrementa en gran medida el sentimiento de preocupación hacia los efectos secundarios que pueden desencadenar algunos componentes de estos novedosos productos, especialmente enfocado a la posible distribución a lo largo de los diferentes compartimentos ambientales y, en mayor medida, a la influencia que pueden tener sobre la salud. Así, hoy en día adquieren mayor importancia los crecientes niveles de diversos contaminantes emergentes, referidos en la mayoría de los casos a aquellos compuestos no regulados que pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de las conclusiones obtenidas sobre sus efectos potenciales sobre la salud y los datos monitorizados con respecto a su incidencia. Este término engloba a una gran variedad de familias de compuestos químicos, entre ellas los productos de cuidado personal (PCPs), retardantes de llama (FRs), aditivos industriales, antisépticos, esteroides... [1].

Entre las diferentes familias de contaminantes emergentes, la presente Tesis Doctoral centrará sus investigaciones en tres de ellas:

- Agentes antimicrobianos: en particular sobre siete parabenos y el triclosán, ampliamente utilizados como PCPs (jabones, dentífricos, etc.), en productos farmacéuticos y en cierto tipo de alimentos procesados. De gran importancia por el potencial estrogénico que pueden presentar los parabenos, incluso a niveles bajos, siendo este efecto mayor al aumentar el tamaño de la cadena [2]. En el caso del triclosán su importancia reside en sus productos de degradación que presentan efectos tóxicos de mayor importancia, como dioxinas o clorofenoles [3]. Se evalúa también, en uno de los trabajos, la presencia de dos derivados clorados de los parabenos, obtenidos mediante reacción de los mismos con el cloro libre presente en las aguas para su desinfección [4]. Estos últimos presentan mayor toxicidad que los correspondientes parabenos, viéndose incrementada la toxicidad con el número de átomos de cloro en la estructura [5].
- Ácidos perfluoroalquilados: las investigaciones estarán centradas sobre siete ácidos carboxílicos perfluoroalquilados (C6 - C12) y el ácido perfluorooctano sulfónico, compuestos caracterizados por la sustitución de los hidrógenos presentes en la estructura por átomos de flúor y por su presencia en un amplio rango de aplicaciones industriales como ingrediente activo, impurezas o como derivados de la degradación de algunos productos, siendo también base de un gran número de productos de consumo diario. Los estudios de toxicidad crónica y aguda revelan la aparición de diferentes

efectos adversos relacionados con la exposición de peces a estos compuestos químicos, siendo mayores al incrementar la longitud de la cadena [6,7]. De especial interés por ser medioambientalmente persistentes debido a la fortaleza inherente y a la gran estabilidad de los enlaces entre los átomos de carbono y flúor, siendo más estables química y térmicamente que los hidrocarburos análogos [8,9].

- Retardantes de llama: considerados para estos estudios nueve éteres de difenil polibromados (PBDEs) y seis nuevos retardantes de llama (NFRs). Los pirorretardantes son ampliamente utilizados como aditivos en la industria textil y polimérica, formando parte de pinturas, termoplásticos, textiles, muebles y espumas, con la función de retrasar e inhibir la aparición del fuego y los procesos de combustión [10,11]. Los PBDEs son compuestos caracterizados por una gran persistencia y un elevado poder de bioacumulación [12], demostrando las diferentes mezclas comerciales una gran variedad de efectos tóxicos en roedores [13-18].

En todos los casos anteriores, su amplia utilización, la carencia de sistemas de control y la escasa sensibilización con el tema, han provocado la emisión indiscriminada al medioambiente fundamentalmente a través de las aguas residuales urbanas, ya sea porque no logran ser eliminados en su totalidad de las aguas, o porque simplemente no han llegado a ser depuradas. Por tanto la presente Tesis Doctoral establece como objetivos:

- ✓ Desarrollo de varios métodos analíticos robustos que permitan detectar por un lado, parabenos y triclosán, por otro los ácidos perfluoroalquilados y un último método para la determinación de retardantes de llama, tanto en matrices acuosas (residuales y superficiales) como en muestras de moluscos, todas ellas procedentes de diferentes puntos de la Comunidad Autónoma de Galicia. Se pretenden desarrollar métodos de extracción que reporten alguna ventaja frente a técnicas de extracción más clásicas, buscando en la medida de lo posible, una menor manipulación de muestra, menor consumo de disolventes orgánicos, mayor simplicidad, reducción de costes globales y mejoras en la sensibilidad y selectividad.
- ✓ Aplicación de la metodología desarrollada a muestras reales, obteniendo de este modo valores preliminares de niveles de contaminación y distribución de estos contaminantes en las costas gallegas.



II. INTRODUCCIÓN



1. COMPUESTOS DE INTERÉS

1.1 PARABENES Y TRICLOSÁN

1.1.1 Definición y aplicaciones

Parabenos

Los parabenos o parabenos (ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico) han sido ampliamente empleados a lo largo de los años como conservantes o estabilizantes en cosméticos y en productos de cuidado personal (PCPs) con la finalidad de prolongar la vida útil de los mismos. Se sintetizaron por vez primera a principios de 1920 para reemplazar a los ácidos salicílico y benzoico en preparados farmacéuticos [19,20]. Debido a su eficacia antimicrobiana, actualmente se encuentran presentes en una gran variedad de productos de consumo diario, principalmente en PCPs (champús, cosméticos, cremas o lociones), compuestos farmacéuticos (anestésicos, jarabes, anticonceptivos o colirios) y alimentos procesados (refrescos, gelatinas, aceitunas, salsas o conservas), y menos frecuentemente en productos industriales y elementos textiles [21,22].

Son productos derivados de la esterificación del ácido *p*-hidroxibenzoico en presencia de alcohol y un correspondiente catalizador (ej. ácido sulfúrico concentrado o ácido *p*-toluenosulfónico) [23]. En función del tipo de sustituyente se pueden encontrar en estos momentos siete diferentes tipos de parabenos en uso: metil (MeP), etil (EtP), *iso*-propil (*i*-PrP), *n*-propil (*n*-PrP), *iso*-butil (*i*-BuP), *n*-butil (*n*-BuP) y bencil (BzP) parabén. Entre ellos, el MeP y el *n*-PrP son los más empleados tanto en los productos alimentarios como en cosméticos [24,25]. En el caso de los preparados farmacéuticos el PrP es uno de los fungicidas más efectivos. No obstante, la combinación de parabenos (más común MeP y *n*-PrP) presenta una mayor efectividad frente a sus formas individuales al incrementar su efecto antimicrobiano [26]. En 1987 se utilizaron alrededor de 7.000 kg de parabenos solamente en productos cosméticos y productos de aseo [27], y se cree que ese valor se ha incrementado notablemente durante los últimos 20 años. Se calcula que los parabenos se encuentran presentes en aproximadamente un 80 % de los PCPs [28].

El interés científico por los derivados clorados comenzó a partir del año 2006 tras los descubrimientos por parte de Canosa et al. [4]. A concentraciones tan bajas como las utilizadas en el tratamiento de las aguas, el cloro reacciona con los parabenos presentes en las aguas originando la formación de los derivados clorados. Canosa et al. [4] observaron que incluso con pocos minutos de contacto entre los cosméticos que contenían parabenos y el agua clorada se originan productos clorados y bromados.

Triclosán

El triclosán (5-cloro-2-(2,4-dicloro-fenoxi)-fenol) lleva siendo utilizado desde hace más de 40 años como agente antimicrobiano en productos desinfectantes, jabones, detergentes, material quirúrgico, dentífricos, enjuagues bucales, champús o como aditivo en plásticos, junto con innumerables PCPs, domésticos, veterinarios e industriales. También es utilizado como principio activo en algunos medicamentos y como biocida de superficie en materiales de contacto con alimentos, para inhibir el crecimiento de bacterias en la superficie, pero sin pretender tener un efecto antimicrobiano en la propia comida. En 1998, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), estimó una producción anual superior a 454 toneladas de este compuesto en los Estados Unidos (USA).

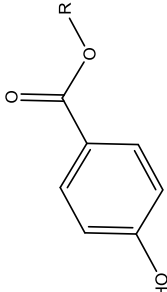
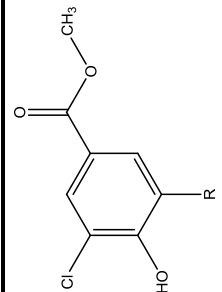
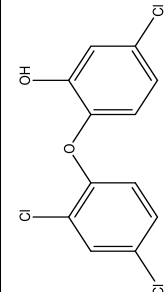
El triclosán es efectivo contra diversos tipos de bacterias (Gram+ y Gram-), levaduras y hongos, evitando la propagación bacteriana y/o provocando la muerte de la bacteria. A bajas concentraciones es bacteriostático (no mata pero sí impide la reproducción), sin embargo a elevadas concentraciones es bactericida [29,30].

Canosa et al. [31] han demostrado la capacidad migratoria de este compuesto hacia los alimentos al poner en contacto una superficie o un recipiente con determinados niveles de triclosán. Como consecuencia, en Marzo de 2010 fue eliminado de la lista de aditivos provisionales en plásticos que puedan permanecer en contacto con alimentos [32].

1.1.2 Estructura y propiedades

En la Tabla II.1 se recogen las estructuras de los diferentes parabenes y triclosán evaluados en la presente Tesis Doctoral, junto con sus correspondientes fórmulas empíricas, pesos moleculares monoisotópicos y propiedades físico-químicas más relevantes desde el punto de vista analítico: pK_a , logaritmo de la constante de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$), la presión de vapor (P_v) y su solubilidad en agua. Todos los valores son experimentales (recogidos en la base de datos PhysProp, *Syracuse Research Corporation* [33]) excepto los marcados con (*), que corresponden a valores calculados mediante *software* proporcionados por la base de datos de SciFinder Scholar [34].

Tabla II.1. Estructura y propiedades físico-químicas de parabenos y triclosán. Datos experimentales recogidos en la base de datos PhysProp, Syracuse Research Corporation [33], o calculados mediante *software* (*) proporcionados por la base de datos SciFinder Scholar [34].

Estructura	Compuesto	CAS	Abreviatura	R	Fórmula empírica	Pm monoisotópico	pK _a	log K _{ow}	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	P _v (mm Hg)
	Metil parabén	99-76-3	MeP	CH ₃	C ₈ H ₈ O ₃	152,05	8,30*	1,96	2,50 10 ³	2,37 10 ⁻⁴ *
	Etil parabén	120-47-8	EtP	CH ₂ CH ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,06	8,34	2,47	8,85 10 ²	9,29 10 ⁻⁵ *
	<i>i</i> -Propil parabén	4191-73-5	<i>i</i> -PrP	CH ₂ (CH ₂) ₂	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180,08	8,40*	2,91	6,90 10 ²	1,16 10 ⁻³ *
	<i>n</i> -Propil parabén	94-13-3	<i>n</i> -PrP	CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180,08	8,23*	3,04	5,00 10 ²	5,55 10 ⁻⁴ *
	<i>i</i> -Butil parabén	4247-02-3	<i>i</i> -BuP	CH ₂ CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194,09	8,17*	3,40	2,24 10 ²	3,81 10 ⁻⁴ *
	<i>n</i> -Butil parabén	94-26-8	<i>n</i> -BuP	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194,09	8,47	3,57	2,07 10 ²	1,86 10 ⁻⁴ *
	Bencil parabén	94-18-8	BzP	CH ₂ Ph	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,08	8,18*	3,56	1,08 10 ²	3,37 10 ⁻⁶ *
	3-cloro metil parabén	3964-57-6	ClMeP	H	C ₈ H ₇ ClO ₃	186,01	6,89*	2,64	2,50 10 ²	8,32 10 ⁻⁴
	3,5-dicloro metil parabén	3337-59-5	Cl ₂ MeP	Cl	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	219,97	5,43*	3,48*	2,00 10 ² *	5,44 10 ⁻⁴ *
	Triclosán	3380-34-5	TCS	-	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	287,95	7,80*	4,76	0,1 10 ²	6,45 10 ⁻⁷

Parabenes

En forma pura, los parabenes son pequeños cristales o polvos cristalinos inertes que no presentan color, olor ni sabor; son higroscópicos con un moderado coeficiente de partición octanol-agua. Presentan una gran estabilidad química (estables a un amplio rango de temperaturas y en un rango de pH desde 4,5 a 7,5 (forma neutra)). La solubilidad en agua aumenta con el pH (forma aniónica a pH básicos) y son resistentes a la hidrólisis tanto en disoluciones ácidas como en agua (caliente y fría), mientras que en soluciones alcalinas se hidrolizan al ácido *p*-hidroxibenzoico y su correspondiente alcohol. En general, cuanto mayor es la longitud de la cadena mayor es la resistencia a los procesos de hidrólisis en disoluciones acuosas [27].

Las propiedades antibacterianas de los parabenes están directamente relacionadas con la longitud de la cadena del grupo éster, y así por ejemplo el BuP posee cuatro veces una mayor habilidad para inhibir el crecimiento microbiano en comparación con el EtP. Sin embargo, simultáneamente con el incremento de la longitud de la cadena el valor del coeficiente de partición octanol-agua aumenta, y como consecuencia disminuye su solubilidad en agua [27,35]. Por tanto, ya que la replicación microbiana tiene lugar en fase acuosa se necesitan aquellos parabenes con mayor solubilidad para ejercer la actividad antimicrobiana. Por ello, se suelen escoger los parabenes de cadena corta como el MeP y el *n*-PrP para el uso en alimentos, mientras que los ésteres de cadena larga tienen escasas aplicaciones [12].

Los derivados clorados son más ácidos y más lipofílicos que los correspondientes compuestos nativos. El ritmo de formación de estos derivados clorados se incrementa con la temperatura. Este fenómeno es preocupante debido al potencial estrogénico desconocido [4,36] y mayor estabilidad que los correspondientes parabenes, con un aumento de la estabilidad a medida que se incrementa el número de sustituyentes halogenados en la cadena [37].

Triclosán

En el mercado se suele emplear con un 99 % de pureza y se encuentra disponible en estado sólido como un polvo cristalino blanco y con apenas olor. Es un compuesto estable con un punto de ebullición entre 280 y 290 °C y un punto de fusión entre 54 y 57 °C. Su estabilidad térmica (soporta condiciones de 200 °C durante 2 horas) lo hace adecuado para su incorporación a diferentes fibras y materiales plásticos. Presenta un carácter lipofílico más acusado que los parabenes, con un log K_{ow} de 4,76. Se trata de un compuesto

ligeramente ácido que no se solubiliza fácilmente en agua (10 mg L^{-1} a 20°C), incrementando este parámetro con el pH, por lo que su solubilidad será mayor en un medio alcalino (forma aniónica); sin embargo, se disuelve con una gran facilidad en disolventes orgánicos [38].

1.1.3 Toxicidad

Parabenes

Desde su introducción en el mercado a principio de los años 20, los parabenes han sido considerados compuestos seguros con importantes aplicaciones en la vida diaria. Las primeras informaciones hablaban de compuestos no tóxicos, no sensibilizantes y libres de efectos irritantes [35,39,40]. Sin embargo, con el paso de los años estudios más recientes empiezan a presentar puntos de vista diferentes en los que su comportamiento y toxicidad quedan en entredicho.

La mayor parte de los estudios de acumulación defienden una hidrólisis completa en el organismo humano y la formación de metabolitos de menor toxicidad excretados en su totalidad a través de la orina, siendo considerados por tanto compuestos no acumulables en el organismo [35,41-45]. No obstante, todo cambia a partir del año 2004 cuando se detecta la acumulación de parabenes no hidrolizados en tejidos tumorales de pecho humano, vinculándose a una absorción transepidérmica por el uso de desodorantes y numerosos cosméticos con aplicación cercana [46]. Estudios posteriores corroboran esta idea tras detectar la presencia de las formas no hidrolizadas en muestras de orina [47,48] y aguas residuales [49,50]. Años más tarde, se encontró relación entre el tipo de exposición y la probabilidad de detección de los compuestos no hidrolizados, siendo la exposición por vía dérmica la que origina una mayor formación de los mismos frente a la exposición por vía oral [51].

En cuanto a la evaluación de la toxicidad aguda y crónica, todas las investigaciones concluyen con una relación directa entre la toxicidad y la longitud de la cadena de los parabenes [5,45,52,53]. En uno de los estudios realizados con organismos acuáticos, Dobbins et al. [54] evaluaron la toxicidad crónica de los parabenes en crustáceos (*Daphnia magna*) y peces (*Pimephales promelas*), encontrando más tóxicos aquellos parabenes de cadena larga como el BzP o el BuP (concentración letal media (LC_{50}): $4,0$ y $5,3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente), mientras que el MeP y el EtP (LC_{50} : $24,6$ y $18,7 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) presentaban niveles de toxicidad notablemente más bajos. Parece que este comportamiento se sigue tanto en bacterias como en los diferentes grupos tróficos [55]; sin

embargo, no existen efectos sinérgicos sobre la toxicidad al emplear parabenes combinados [56]. Del mismo modo, un mayor número de ramificaciones y la presencia de anillos aromáticos en la cadena hidrocarbonada del grupo éster conlleva un notable incremento de la toxicidad [57].

Estudios *in vitro* realizados con peces muestran que los parabenes pueden provocar respuestas estrogénicas a niveles bajos. Estos efectos son mayores al aumentar la longitud de la cadena, siendo por tanto el BzP el parabén más tóxico y con mayores efectos endocrinos [5,57-59]. La exposición a algunos de estos compuestos está relacionada con respuestas uterotróficas en ratas (aumento del tamaño en el útero) [57,58], síntesis de vitelogenina (VTG) en peces macho [60-62] e inhibición de la espermatogénesis en ratones [63]. Los efectos generados en organismos acuáticos se obtuvieron tras exposiciones constantes a estos compuestos [54]; sin embargo, los datos preliminares sobre las concentraciones medioambientales sugieren sólo un riesgo mínimo, siendo la concentración efectiva casi 1.000 veces superior a la que se encuentra en aguas superficiales. Por otro lado, en base a todos estos resultados, se han incluido algunos de los parabenes (MeP, EtP, *n*-PrP) en la Categoría 1 de la lista Europea de disruptores endocrinos potenciales, cuyas propiedades y efectos todavía deben ser estudiados más en profundidad [64].

En cuanto a los derivados clorados, se trata de compuestos potencialmente más tóxicos para los organismos acuáticos que sus respectivos compuestos nativos, aumentando la toxicidad al incrementar el número de átomos clorados presentes en la estructura [5].

Triclosán

Su elevada presencia en la formulación de PCPs conllevó un notable incremento del número de investigaciones con el objetivo de estudiar y establecer sus posibles efectos tóxicos. No obstante, los estudios no se centran en el compuesto en sí mismo, sino también en sus posibles productos de degradación (dioxinas, clorofenoles y cloroformo [3,65]) que en este caso presentan efectos tóxicos de mayor importancia. Las dioxinas son unos de los más preocupantes, generadas durante la fabricación, incineración y como resultado de reacciones de fotólisis (2,8-diclorodibenzodioxina (DCDD)) que tienen lugar en el medioambiente ya sea por luz UV o visible [66-69]. Los clorofenoles (2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol), sin embargo, se producen por la reacción entre el triclosán y el cloro libre presente en el agua incluso cuando este último se encuentra a bajas concentraciones como las detectadas en aguas potables [3,65,66,70]. Sin embargo, estos no son los únicos

productos generados a partir del triclosán. Durante el tratamiento de las aguas residuales el triclosán se transforma en metiltriclosán (MTCS) por metilación biológica [71], compuesto más lipofílico, con elevada resistencia a la biodegradación y a la fotólisis [72], siendo por tanto un compuesto con mayor persistencia medioambiental que el compuesto nativo.

Entre las posibles rutas de entrada en el organismo se demostró una absorción principalmente dérmica [73,74], y se confirman las heces y la orina como principales vías de eliminación tanto para roedores [75] como para seres humanos [76]. No obstante, otras investigaciones detectaron, además del triclosán, varios metabolitos en la excreción urinaria, entre ellos el 2,4-diclorofenol [77]; confirmando junto a todo lo anterior un bajo potencial de acumulación en el organismo tanto del triclosán como de sus metabolitos [78,79].

Los estudios de toxicidad presentan a los organismos invertebrados y a las algas ligeramente más sensibles que los peces y las plantas vasculares tanto bajo períodos de tiempo breves (toxicidad aguda), con niveles de LC_{50} entre 0,125 y 0,2 mg L⁻¹ [80], como bajo exposiciones prolongadas (toxicidad crónica) [80,81]. Destacar que en medio acuático el triclosán se encuentra como forma ionizada y como forma no ionizada, siendo esta última la principal responsable de la mayoría de los efectos tóxicos. No obstante, esta toxicidad disminuye con el incremento del pH, demostrándose también que el triclosán en forma no iónica es ligeramente más tóxico que la forma ionizada [80].

Los resultados de diferentes investigaciones sugieren que el triclosán es débilmente estrogénico [82,83], vinculado con la generación de alteraciones en peces, principalmente en el modo de nadar [80,84,85], el tamaño y la proporción de sexos [82], induce la síntesis de VTG [83] y reduce el número de espermatozoides [86]; sin embargo parece no poseer apenas efectos sobre la hormona tiroidea tras ensayos realizados con ranas [87].

De modo general, se puede decir que no existen resultados concluyentes para ser considerado un compuesto genotóxico, mutagénico o carcinogénico. Sin embargo, sí existen unas pocas investigaciones en las que el triclosán muestra un comportamiento genotóxico para sistemas no mamíferos como algas y bivalvos [88-91].

1.1.4 Legislación

A lo largo de la presente sección se introducirán las diferentes normativas y reglamentos vigentes en la Unión Europea (EU) y otras partes del mundo como USA y Canadá, destinadas a controlar y limitar el uso de estos compuestos.

Parabenos

En la actualidad el uso o la aplicación de estos analitos se encuentran legislados en la EU, principalmente en cosméticos, alimentos y fármacos; sin embargo, todavía no existe ningún tipo de reglamento destinado a establecer valores máximos de estos contaminantes en el medioambiente pese a su amplia distribución ambiental.

El MeP está registrado de acuerdo con la legislación química Europea REACH, (Reglamento Europeo relativo al Registro, la Evaluación, la Autorización y la Restricción de las Sustancias y Preparados Químicos), mientras que el resto se encuentran exclusivamente pre-registrados mediante numerosas notificaciones. Sin embargo, debido a la diversidad de aplicaciones no todos los productos en los que se usan los parabenos están regulados bajo la REACH, existen diferentes normativas y recomendaciones en función de su uso [92].

Los parabenos se introducen por primera vez en Europa en la regulación de cosméticos en 1982 (Directiva 82/368/EEC [93]) tras ser admitidos como conservantes en su composición. Sin embargo, las opiniones generadas por diferentes organismos, como el Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (SCCS) [94] o el gobierno de Dinamarca [95], generaron presión para un endurecimiento de las normativas. Actualmente, el uso del *i*-PrP, *i*-BuP y BzP en cosméticos está prohibido, quedando restringidos sólo a agentes antimicrobianos (Reglamento 358/2014 [96]). La concentración máxima autorizada del *n*-PrP y *n*-BuP es de hasta un 0,14 % (ácido) para la suma de las concentraciones individuales y 0,8 % (ácido) para las mezclas de sustancias cuando la suma de las concentraciones no exceda del 0,4 %; mientras que para el MeP y el EtP se mantienen los niveles previamente establecidos, siendo la concentración máxima autorizada de 0,4 % para un éster y 0,8 % para mezcla de ésteres (Reglamento 1004/2014 [97]).

En cuanto a la legislación existente fuera de EU, las unidades gubernamentales en USA (Agencia de Drogas y Alimentos (FDA)) y Canadá (*Canada Health*) recomiendan los mismos límites establecidos para los parabenos en cosméticos que los establecidos en EU. Sin embargo, no existe legislación que regule las concentraciones de parabenos en cosméticos en ninguno de estos países [98,99].

La regulación en alimentos empieza a desarrollarse a partir de 1964 (Directiva 64/54/EEC [100]) con la publicación de una lista de aditivos autorizados para su uso en alimentos. Desde entonces y hasta la fecha, estas normativas han sufrido varias modificaciones recogiendo en diferentes Directivas y Reglamentos los niveles de dosis máximas permitidas según el tipo de alimento (Directiva 95/2/EC [101], Reglamento 1333/2008 [102], Reglamento 1129/2011 [103] y Reglamento 1130/2011 [104]). Por otro lado, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió un comunicado especial en el año 2004 [105] donde establece un valor de Ingesta Diaria Admisible (ADI) entre 0 y 10 mg kg⁻¹ de peso corporal (bw) para la suma del MeP y EtP. Aunque inicialmente se permitían el uso de tres de los parabenos (MeP, EtP y *n*-PrP) [101], el *n*-PrP fue eliminado de la lista tras las consideraciones emitidas por la EFSA en relación con sus efectos endocrinos [106], quedando por tanto el MeP y EtP como los únicos ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico actualmente aceptados como conservantes en alimentos.

En USA el MeP y EtP se adicionan directamente en alimentos y están considerados como aditivos GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por parte de la FDA [107], siempre y cuando su uso no se encuentre a niveles superiores al 0,1 % en alimentos [108]. En otros países como Canadá o Japón también aprueban el uso de estos parabenos como agentes antimicrobianos para el uso en alimentos [109].

Triclosán

Al igual que los parabenos, existen diferentes normativas para regular el uso de triclosán en diferentes ámbitos, sin embargo, tampoco se encuentra legislación en el medioambiente. De acuerdo con la Directiva sobre biocidas (98/8/EC [110]) de la Unión Europea, el uso del triclosán está permitido en productos orientados hacia: la higiene humana, el área de la salud pública y privada, la higiene veterinaria y para su uso como conservantes tanto de película como en fibra de cuero, caucho y conservación de materiales polimerizados. No obstante, no existen normativas en cuanto a límites máximos para todas ellas.

En lo referente a la higiene humana existen varias normativas que limitan su regulación en cosméticos en Europa. Se introduce por primera vez en 1982 (Directiva 82/368/EEC [93]) como conservante provisionalmente admitido en la composición de cosméticos estableciendo niveles máximos autorizados de un 0,3 %, niveles defendidos también por parte del Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios Destinados a los Consumidores (SCCNFP) [111]. Sin embargo, no fue hasta el año 2014 cuando tras las constantes opiniones de diferentes organismos, como el Comité

Científico Noruego de Seguridad Alimentaria (SCFS Noruego) [112] y el Comité Científico de los Productos de Consumo (SCCP, nombre del SCCS antes del 2009) [113,114], se modifican estos niveles fijando finalmente niveles de 0,3 % para dentífricos, pastillas de jabón, jabones líquidos, geles de ducha, desodorantes, polvos faciales, cremas correctoras, productos para uñas y estableciendo en colutorios una concentración máxima de 0,2 %; todas estas modificaciones quedaron recogidas en Reglamento 358/2014 [96].

El Gobierno de Canadá, considera actualmente seguro el uso del triclosán a concentraciones de hasta 0,03 % en enjuagues bucales y 0,3 % en otros productos cosméticos [115], estando estos límites en cosméticos en consonancia con los establecidos en la EU.

En cuanto a su uso como conservante en la EU, se encontraba incluido en la Directiva 2002/72/EC [116], como aditivo permitido para el uso en materiales de contacto con alimentos siendo considerado como biocida de superficie y prohibiendo en todo caso su uso como agente antimicrobiano en la comida. La evaluación llevada a cabo por el SCFS y la EFSA en el 2004 [117], avalaban su uso siempre y cuando éste no migrase a los alimentos en cantidades superiores a 5 mg kg⁻¹ de alimento. A partir del 2010, se prohíbe su inclusión como aditivo en el material plástico destinado a entrar en contacto con los alimentos (Decisión de la Comisión 2010/169/EU [32]), posiblemente influenciado por la decisión previa de Alemania [118].

1.1.5 Interés medioambiental

Las aguas residuales procedentes de los domicilios o de zonas industriales suelen presentar un alto contenido de agentes contaminantes empleados como parte de nuestra rutina diaria; convirtiéndose, en consecuencia, en la principal vía de entrada en el medioambiente [119-123]. No obstante, antes de alcanzar o ser distribuidos en los diferentes compartimentos ambientales, atraviesan tratamientos específicos en las estaciones depuradoras de aguas residuales (WWTP) con el objetivo de eliminar en la medida de lo posible la presencia de los contaminantes químicos. Sin embargo, debido a la diferente naturaleza de los diferentes compuestos, los tratamientos de eliminación pueden no resultar efectivos, logrando alcanzar a través de los efluentes las aguas superficiales (ríos, lagos, mares, océanos) y en algunos casos pudiendo afectar a las aguas potables. Adicionalmente a lo anterior, es necesario destacar el carácter lipofílico de algunos de estos compuestos, ya que pueden originarse problemas de bioacumulación en los diferentes organismos. Siguiendo esta ruta, el principal objetivo de la presente memoria es mostrar los

niveles que pueden detectarse tanto en biota como en aguas (principalmente de ríos, aguas residuales, mar y rías). En las Tablas II.2, II.3, II.4 y II.5 se recogen los niveles de parabenos y triclosán encontrados en diversas muestras de aguas y biota, respectivamente.

Parabenos

A. Aguas

En la actualidad, las actividades industriales destinadas a la fabricación o comercialización de parabenos están consideradas una de las principales vías de entrada directa en el medioambiente, quedando demostrada su influencia tras la detección de elevados niveles de concentración de estos analitos en las zonas costeras o ríos próximos a las áreas industrializadas [124-126]. Sin embargo, ésta no es considerada la única causante de los elevados niveles presentes en el medioambiente. La mayor parte de los parabenos, normalmente presentes en los diferentes PCPs, se detectan en las aguas residuales domésticas [37,125,127,128]. Las WWTP presentan un satisfactorio poder de eliminación de estos compuestos, mediante tratamientos biológicos, superior a un 90 %, con lo que consigue reducir las concentraciones en las aguas residuales provenientes de los domicilios (influentes) para generar aguas ya tratadas (efluentes) de menor concentración [129,130]. El MeP y el *n*-PrP son los parabenos detectados con mayor frecuencia en las aguas de efluentes e influentes, alcanzando valores de hasta 79.000 ng L⁻¹ y 41.000 ng L⁻¹, respectivamente [50,131-136]. También suelen encontrarse el EtP, *n*-BuP e *i*-BuP aunque a concentraciones algo más bajas (desde unos pocos ng L⁻¹ hasta unos pocos cientos de ng L⁻¹) [49,50,133,137]. A niveles bastante más bajos se detectó el *i*-PrP, presentando concentraciones por debajo del rango de los ng L⁻¹ [37,125]. El BzP raramente se encuentra presente y cuando se detecta no supera unas pocas decenas de ng L⁻¹ [124,138].

A pesar de las diferentes rutas seguidas por los parabenos en el medioambiente y los diferentes volúmenes de producción, la concentración de estos compuestos en sedimentos y en lodos de depuradoras es baja (no suele ser superior a 100 µg g⁻¹), lo que sugiere que los parabenos se suelen encontrar presentes mayoritariamente en la fase acuosa del influente (> 97 %), probablemente debido a su moderada solubilidad en agua [129,132]. No obstante, la detección del principal producto de degradación de los parabenos (ácido *p*-hidroxibenzoico) a niveles de concentración relativamente altos (hasta 8.400 ng L⁻¹) en aguas residuales y efluentes, muestra la posibilidad de degradación de los de los mismos en las WWTP [131]. Canosa et al. [4] demuestran que tras la exposición incluso a pequeñas cantidades de cloro, las concentraciones de parabenos logran reducirse

hasta un 97 % [139] en pocos minutos. El tiempo de vida medio de los parabenes en aguas residuales se encuentra comprendido entre 9,6 y 35,2 horas, degradándose antes los parabenes de cadena larga [37], siendo, bajo ciertas circunstancias, el isómero ramificado menos biodegradable que el lineal [133]. En el medio acuático, no se espera que las principales rutas de eliminación de los parabenes sean la volatilización ni la hidrólisis. Sin embargo, tras experimentos de degradación con luz solar se observa una ligera descomposición del BuP y BzP, donde el tiempo de vida medio del BuP (350 - 580 h) es significativamente superior frente al BzP (11 - 15 h) [140]. También se aprecia una rápida biodegradación de los parabenes bajo condiciones aeróbicas [45,141], mientras que bajo condiciones anaeróbicas se degradan parcialmente, siendo el MeP el más rápido [45]. En el caso de los derivados halogenados presentan cinéticas de biodegradación más lentas que sus relativos compuestos nativos [37].

A pesar de la eficacia de los tratamientos de las WWTP en cuanto a la eliminación, los parabenes todavía se siguen detectando en muestras de ríos a bajas concentraciones en el rango de los ng L^{-1} debido a la descarga continua a través de las aguas recreacionales y domésticas, aguas residuales urbanas e industriales, descargas aleatorias (descargas directas de aguas no tratadas) o fugas de las aguas residuales municipales. Se han detectado diferentes niveles de concentración de parabenes en un mismo río, coincidiendo los valores máximos en las zonas posteriores a la zona de descarga de los efluentes procedentes de las depuradoras o a partir de las áreas o zonas industrializadas [124,142,143]. También se aprecian diferencias en la concentración de los parabenes en función de la estación del año, con mayores concentraciones en períodos de flujos elevados [124] y también en períodos de flujos bajos [135,144], la primera de las situaciones probablemente como consecuencia de la imposibilidad de tratamiento por parte de las depuradoras de elevados volúmenes de influentes, permitiendo una descarga directa de parabenes en el río, en el segundo caso como resultado de una baja dilución de las descargas percibiendo así un aumento en las concentraciones. La elevada presencia de MeP y *n*-PrP usados en combinación en productos cosméticos [145,146] explica la elevada frecuencia de detección de ambos compuestos. Se aprecia una clara diferencia entre los niveles de concentración de los parabenes en efluente frente a las concentraciones en muestras de ríos que reciben las descargas, debido principalmente a la dilución en el río, a la biodegradación y a la absorción en sedimentos. Los niveles más altos detectados hasta la fecha en estas aguas son provenientes de ríos de China, donde los niveles de MeP y *n*-PrP logran alcanzar hasta 1.062 y 3.142 ng L^{-1} , respectivamente [144]. A menores concentraciones se detectan en otros ríos el EtP con valores de hasta 114 ng L^{-1} [147] y el *n*-BuP hasta 181 ng L^{-1} [142]. Sin embargo, el *i*-PrP y el BzP no suelen detectarse con facilidad.

Hasta la fecha, los niveles máximos se detectaron en Japón alcanzando valores de 46 ng L^{-1} para el *i*-PrP [53], mientras que el BzP no supera los $26,4 \text{ ng L}^{-1}$ [148].

Las descargas procedentes de los ríos fueron identificadas como la principal fuente de entrada de los parabenos en mares y océanos. Las investigaciones orientadas al estudio de estos analitos en aguas de mar o incluso en las zonas donde se ponen en contacto ambos tipos de aguas, como estuarios (el mar entra hacia la desembocadura del río y por tanto es una zona de alto contenido en cloruro sódico) o rías (el río se introduce en el mar y por tanto es una zona de bajo contenido en cloruro sódico), han sido muy escasas. Destaca el trabajo de investigación realizado por Jonkers et al. [149] en el que se estudia la presencia de algunos parabenos en diferentes tipos de aguas (río, mar, estuarios y aguas residuales). En él se demuestra que los niveles presentes en estuarios y en aguas de mar son notablemente inferiores a los detectados en los ríos, debido principalmente a la dilución de la concentración. Se alcanzan niveles de MeP comprendidos entre $2,1$ y 51 ng L^{-1} en todas las muestras de estuarios analizadas. Las frecuencias de detección y las concentraciones presentes de otros parabenos como el EtP y *n*-PrP son relativamente inferiores, encontrando niveles de hasta $6,7 \text{ ng L}^{-1}$ (EtP) y $7,9 \text{ ng L}^{-1}$ (*n*-PrP). Por el contrario, el *n*-BuP y el BzP son los parabenos menos detectados en estas aguas, llegando a alcanzar concentraciones máximas de $0,2$ y $0,3 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente. Las escasas investigaciones centradas en agua de mar revelan concentraciones bastante similares a las anteriores proporcionando valores de hasta 62 ng L^{-1} (MeP), 15 ng L^{-1} (EtP), $6,6 \text{ ng L}^{-1}$ (*n*-PrP) y $7,1 \text{ ng L}^{-1}$ (*n*-BuP).

Como casos más aislados, pese a no encontrarse relacionado con el ámbito de aplicación de la presente Tesis Doctoral, es importante hacer hincapié en la importancia de la eliminación de estos compuestos del medioambiente. Aunque sea en menor medida, los parabenos pueden depositarse en los lodos de las depuradoras que son empleados con fines agrícolas, donde la presencia de estos compuestos puede llegar a las aguas subterráneas y, por consiguiente, alcanzar las aguas potables o minerales. Teniendo en cuenta la reactividad con el cloro [4,139,150] y con el ozono [151], la concentración de parabenos en las aguas de grifo será extremadamente baja o incluso nula. Actualmente, existen pocos estudios centrados en la determinación de parabenos en aguas potables [127,128,131,135,142,152]. Sin embargo, se detectaron en repetidas ocasiones el MeP, presentando valores de hasta 3.830 ng L^{-1} en diferentes muestras de agua de grifo [135], y el *n*-PrP con niveles de hasta 160 ng L^{-1} [152]. Por otro lado, el BuP y EtP han sido detectados en un menor número de ocasiones con niveles de 161 ng L^{-1} [142] y 41 ng L^{-1} [152], respectivamente.

Tabla II.2. Rango de concentraciones (ng L^{-1}) detectadas de parabenes en muestras de agua. (nc: no cuantificable, nd: no detectable)

PAÍS	MUESTRA	MeP	EtP	i-PrP	n-PrP	i-BuP	n-BuP	BzP	ClMeP	Cl ₂ MeP	REF.
España	influyente	nd - 14.243	nd - 5.927	nd - 355	nd - 23.593	nd - 110	nd - 681	nd - 655	12 - 61	8 - 90	[37,125,127,131]
	efluente	nd - 328	nd - 48	nd - nc	nd - 233	nd - nc	nd - 83	nd - 681	nd - 6,9	nd - 12	[37,125,131,133,134,153]
	río	nd - 510	nd - 114	nd - 46	nd - 1.255	nd - 7,9	nd - 54,1	nc - 26,4	-	-	[53,127,131,142,148,154]
USA	influyente	2.720 - 79.600	-	-	760 - 6.130	83 - 390	-	-	-	-	[130,135,155]
	efluente	-	-	-	nc - 3,7	nc - 3,6	-	-	-	-	[130]
	río	2,2 - 17,3	nd	-	nd - 12	-	nd - 0,2	-	-	-	[156]
Japón	influyente	1.400 - 2.400	52 - 57	nd	2.200 - 2.600	nd	370 - 450	nd	nd	-	[150]
	río	nd - 676	nd - 73,6	nd - 46	nd - 207	nd - 13	nd - 163	nd - 2,3	nd	nd - 6,1	[53,150,157]
	influyente	nd - 400	nc	-	nd - 500	-	700 - 1.100	-	-	-	[158]
Portugal	efluente	13 - 31	nc - 6,6	-	nc - 21	-	0,2 - 3,9	nc	-	-	[149]
	río	nc - 45	nc - 6,4	-	nc - 64	-	nc - 4,2	nc - 0,3	-	-	[149]
	mar	5,1 - 62	nc - 15	-	nc - 61	-	nc - 7,1	nc	-	-	[149]
Dina-marca	influyente	100 - 17.462	nc - 10.519	-	nc - 18.631	100 - 8.000	nc - 17.000	12,4 - 13,5	-	-	[126,136]
	efluente	nd - 262	nd - 290	-	nc - 231	nc - 147	nc - 550	nd	-	-	[126,139]
	influyente	661 - 30.688	192 - 3.312	-	nc - 8.286	-	nc - 1.595	-	-	-	[143]
Reino Unido	efluente	nd - 155	nc - 69	-	nc - 95	-	nc - 2	-	-	-	[143]
	río	nc - 400	nc - 15	-	nc - 24	-	nc - 52	-	-	-	[143,159]

Aunque menos frecuentes, algunas investigaciones también analizaron la presencia de parabenos en piscinas [127,154,160] y en agua embotellada. Los resultados hasta ahora han sido muy dispares en cuanto a su presencia en este tipo de aguas. Un estudio realizado en España en aguas de piscina muestra la presencia de *n*-PrP (32,3 ng L⁻¹) y *n*-BuP (77,5 ng L⁻¹), sin embargo, no se pudieron cuantificar ni el MeP ni EtP [154]. Terasaki et al. [36] evaluaron diferentes aguas procedentes de piscinas japonesas sin detectar restos de ningún parabén (MeP, EtP, *n*-PrP, *i*-PrP, *n*-BuP y *i*-BuP), a excepción del BzP (28 ng L⁻¹).

Los derivados halogenados han sido monitorizados en diferentes tipos de aguas, detectándose en muestras de aguas no tratadas [4,37,150]. En la investigación llevada a cabo por Canosa et al. [4] no fue posible realizar la cuantificación del Cl₂MeP puesto que no existía un estándar de este derivado clorado en el mercado. Sin embargo, en dos de las cinco muestras analizadas, las áreas del pico del Cl₂MeP eran mayores a las originadas por el MeP. En otro estudio, el ClMeP y el Cl₂MeP se detectaron en todos los influentes procedentes de tres plantas depuradoras urbanas a niveles similares (medias entre 40 y 46 ng L⁻¹, respectivamente), permaneciendo todavía presente en las muestras de efluente (entre 1,2 y 2,6 ng L⁻¹, respectivamente) [37]. Muy superiores han sido las concentraciones encontradas por Terasaki et al. [150] en una planta depuradora de Japón, donde se detectaron niveles de Cl₂MeP comprendidos entre 2.100 y 2.300 ng L⁻¹ en muestras de influente. En muestras de río se detectaron varios derivados clorados, entre ellos en Cl₂MeP (6,1 ng L⁻¹), mientras que el ClMeP no ha sido detectado en ningún momento [150]. Los parabenos mono- y di- clorados han sido detectados también en muestras de aguas de piscinas con concentraciones iguales o inferiores al límite de cuantificación (LOQ: 10 ng L⁻¹). En muestras de agua de grifo los derivados clorados todavía no han sido estudiados.

B. Biota

Hasta el momento, los estudios realizados en muestras de peces son muy escasos en comparación con los orientados a muestras acuosas. Esto es debido, como se comentó anteriormente, al rápido proceso de degradación que tiene lugar en los medios acuáticos, ya sea por medio de la luz solar o mediante procesos de biodegradación bajo condiciones aeróbicas. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de alcanzar el medio marino y por consiguiente la fauna que en él habita. Por otro lado, cabe destacar el amplio uso de los mejillones como principal bioindicador de diversos contaminantes en el medio marino al ser considerado un animal con elevado poder de concentración. Además, la presencia de estos contaminantes en biota puede considerarse otra de las principales vías de entrada por medio de la ingesta hacia los seres humanos, a parte del contacto directo con los PCPs.

Hasta la fecha, los estudios realizados emplean principalmente muestras de peces, sin embargo, ninguno de ellos se ha desarrollado con moluscos y más específicamente con mejillones. Por tanto, se cree que este nuevo enfoque introducido en la presente Tesis Doctoral podría proporcionar nuevos e interesantes valores a tener en cuenta en futuras investigaciones. En la Tabla II.3 se recogen las concentraciones de los parabenos detectados en muestras de biota, principalmente de peces.

Teniendo en cuenta los criterios de persistencia basados en el tiempo de vida medio proporcionados por el Programa Medioambiental de las Naciones Unidas (UNEP) en el año 2001 [161], se supone que la persistencia de los parabenos en el medio acuático es baja; sin embargo, varios estudios muestran su persistencia al ser detectados algunos de ellos en muestras de biota [162-164]. Es necesario destacar que ninguna de las muestras empleadas en los anteriores estudios fue recogida en el medio marino, sino que la mayor parte eran provenientes de ríos o bahías. En este aspecto, cabe destacar que la presente memoria empleará moluscos marinos para estudiar su presencia en el medio marino.

Entre los diferentes estudios realizados con muestras de peces, destacan los valores detectados en diferentes especies procedentes de la zona costera de Filipinas [163,164], entre los que lograron detectarse el MeP, EtP, *n*-PrP y *n*-BuP alcanzando niveles de hasta 3.600, 840, 1.100 y 70 ng g⁻¹ peso lipídico (lw), respectivamente [164]. Por otro lado, la investigación realizada por Kim et al. [163] en la misma zona proporciona también valores elevados, con niveles de hasta 3.450, 183, 1.140 y 37,3 ng g⁻¹ lw para el MeP, EtP, *n*-PrP y *n*-BuP, respectivamente. Ambas investigaciones se realizaron con muestras de tejido muscular de las diferentes especies.

Se realizó también un estudio con 50 especies diferentes de peces procedentes de cuatro ríos que desembocan al mar Mediterráneo (España) [162], donde se encontraron niveles máximos en torno a 85 ng g⁻¹ peso seco (dw) para el MeP, prácticamente detectado en todas las muestras. Mientras que el *n*-PrP y el EtP se encuentran en una menor proporción de las especies con valores de hasta 7,43 y 0,82 ng g⁻¹ dw. Los valores más elevados se corresponden con los del MeP y *n*-PrP en muestras de truchas (*Salmo trutta*) recogidas en zonas próximas a la descarga de efluentes procedentes de una planta depuradora de aguas. Destaca en este estudio, en comparación con los anteriores, la presencia del BzP en aproximadamente un 22 % de las muestras analizadas con valores de hasta 0,50 ng g⁻¹ dw, pudiendo ser considerado en este caso el compuesto más frecuente después del MeP (encontrado en un 46 % de las muestras). Quizá la diferencia entre los niveles detectados en ambas zonas puede ser atribuida al elevado volumen de producción y a la frecuencia de uso de cada parabén. Por último, también se llevó a cabo una investigación en Pensilvania, para estudiar la presencia de estos contaminantes en los

tejidos cerebrales de 58 peces procedentes de los ríos de la zona, sin embargo, a diferencia de los anteriores estudios, no se ha encontrado ningún parabén en ninguna de las muestras estudiadas [156].

Tabla II.3. Rango de concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{dw}$) detectadas de parabenos en muestras de peces.

PAÍS	MUESTRA	ZONA	MeP	EtP	<i>n</i> -PrP	<i>n</i> -BuP	BzP	REF.
España	todo	río	nd - 84,69	nd - 0,82	nd - 7,43	-	nd - 0,54	[162]
Filipinas	músculo	bahía	nd - 3.600 ^a	nd - 840 ^a	nd - 1.140 ^a	nd - 70 ^a	-	[163,164]
USA	cerebro	río	nd	nd	nd	nd	nd	[156]

^a Concentración en $\text{ng g}^{-1} \text{lw}$.

nc: no cuantificable, nd: no detectable.

La gran diferencia entre las concentraciones encontradas en los peces depende principalmente del tipo de muestra a analizar. Esto puede ser explicado en base a la elevada solubilidad y disponibilidad del MeP en aguas frente a otros parabenos [164], junto con el fenómeno de absorción, en el que un aumento de la longitud de la cadena provoca una disminución de la permeabilidad, siendo por tanto el MeP el más permeable de los parabenos estudiados [164].

Triclosán

A. Aguas

Al igual que los parabenos, el triclosán logra introducirse en el medioambiente como residuo proveniente de las diversas actividades industriales destinadas a la fabricación o comercialización del mismo y tras el uso continuado en productos antimicrobianos empleados a diario en nuestro hogar. Todas estas actividades originan numerosos residuos que, a través de las aguas residuales, son dirigidos hacia las WWTP con el fin de eliminar o reducir en lo posible la concentración de los mismos.

En el caso del triclosán, la eficacia de eliminación se encuentra comprendida entre un 55 y un 99 %, dependiendo principalmente de las capacidades técnicas de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales [72,123,165-168]. Un estudio realizado en una planta depuradora suiza estimó detalladamente el proceso de eliminación del triclosán de las aguas, en las cuales un 79 % sufre procesos de degradación biológica (principalmente

bajo condiciones aeróbicas [167]), el 15 % se adsorbe en los lodos y un 6 % abandona la planta presente en el efluente [166]. A pesar de ello, el triclosán continúa siendo detectado de forma frecuente en las diferentes aguas residuales, tanto influentes como efluentes [141,143,167,169-173]. Los valores obtenidos en los diferentes estudios realizados son bastante dispares, no obstante, destacan sobre todo los niveles de concentración de hasta 463.000 y 82.000 ng L⁻¹ detectados en aguas de influentes y efluentes, respectivamente, procedentes de una estación depuradora de Reino Unido [143]. Los otros estudios suelen presentar rangos de concentraciones comprendidos entre 2,3 - 86.161 ng L⁻¹ en influentes y entre 5 - 22.100 ng L⁻¹ en efluentes (Tabla II.4). También para el triclosán se han detectado diferencias significativas en cuanto a las concentraciones detectadas en diferentes estaciones del año, siendo el invierno y la primavera las estaciones que presentan menores niveles, probablemente, al igual que los parabenos, debido a la dilución y a la imposibilidad de tratamiento del gran caudal de agua característico de esa época del año [171].

La eliminación incompleta del triclosán de las aguas residuales junto con la persistencia significativa que presentan los agentes antimicrobianos a ser acumulados en los biosólidos (absorción de hasta un 50 %) forman las dos fuentes principales de entrada en el medioambiente; por un lado, mediante la incorporación de los efluentes a ríos y, por otro, debido a la aplicación de estos biosólidos en cultivos que puede desencadenar procesos de filtración accediendo hasta las aguas subterráneas. En base a esto, muchas investigaciones se han orientado hacia el seguimiento de este compuesto en las diferentes aguas, desde las aguas residuales (influyente y efluente) hasta su detección en los ríos [71,171,174-176]. Los niveles máximos detectados hasta la fecha coinciden con los proporcionados por Kasprzyk-Hordern et al. [143] con valores de hasta 24.000 ng L⁻¹; aunque de modo general hasta la fecha suelen encontrarse comprendidos entre 0,11 y 1.023 ng L⁻¹ (Tabla II.4).

Al igual que con los parabenos, la presencia de este compuesto en ríos y en los biosólidos se considera como posibles rutas de entrada para alcanzar otras aguas y organismos. Aunque más escasos, existen algunos estudios enfocados a la detección del triclosán en mares [177,178], lagos [72,179] y estuarios [172,177,180,181]. Por tanto, al tratarse de un número inferior de estudios y al detectarse claros niveles de triclosán en algunas de estas muestras, es necesario continuar con las investigaciones para ayudar a comprender el transporte de este agente antimicrobiano. La presente Tesis Doctoral fijará entre sus objetivos la detección de triclosán en muestras de moluscos, por ello también es de gran importancia conocer los niveles que se pueden encontrar en aguas marinas.

Tabla II.4. Rango de concentraciones (ng L^{-1}) detectadas de triclosán en muestras de aguas.

PAÍS	MUESTRA	TCS	REF.
España	Influyente	nd - 37.800	[133,142,154,169,170,182-184]
	Efluente	nd - 22.100	[133,142,169,182-184]
	Río	nd - 285	[133,142,154,170,184]
USA	Influyente	240 - 86.161	[167,172,175,176,185,186]
	Efluente	10 - 5.370	[167,172,175,176,185,187,188]
	Río	nc - 1.000	[172,175,176,186-190]
Alemania	Influyente	1.099 - 7.300	[71,123,128]
	Efluente	5 - 620	[71,123,128]
	Río	nd - 90	[71,191]
	Mar	0,001 - 6,87	[177]
Reino Unido	Influyente	70 - 463.000	[137,143,173]
	Efluente	33 - 82.000	[137,143,165,173]
	Río	nc - 24.000	[137,143,159,173]
China	Influyente	71,5 - 2.301	[129,178]
	Efluente	22,5 - 112	[129,178]
	Río	2,5 - 1.023	[129,144,178,192]
	Mar	16,2 - 99	[178]
Japón	Influyente	497 - 11.900	[193,194]
	Efluente	260 - 270	[194]
	Río	nc - 190	[180,195]
Canadá	Influyente	10 - 4.010	[49,196]
	Efluente	10 - 360	[49,196,197]
	Río	4 - 8	[197]
Países Bajos	Influyente	1.350 - 21.900	[141]
	Efluente	50 - 1.100	
Suiza	Influyente	500 - 1.300	[72]
	Efluente	42 - 650	[72,166]
	Río	nd - 98	[72,166]

nc: no cuantificable

nd: no detectable

B. Biota

Como se recoge previamente, la dificultad en la eliminación del triclosán mediante los tratamientos empleados en las WWTP origina la emisión indiscriminada a las aguas superficiales, que conlleva una exposición continua de los organismos acuáticos y la acumulación de los agentes antimicrobianos y sus productos de degradación. En la Tabla

II. INTRODUCCIÓN

II.5 se recogen las concentraciones de triclosán detectadas en muestras de biota, principalmente de peces.

Un estudio realizado por Adolfsson-Erici et al. [198] recoge los niveles de triclosán en muestras de bilis de peces procedentes de diferentes partes de un mismo río, al que se incorporan, a una determinada distancia, los efluentes provenientes de una planta depuradora. Las concentraciones de triclosán presentes en los primeros ejemplares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) recogidas en puntos previos a la zona de descarga de efluentes son de 710 ng g^{-1} peso húmedo (ww). Sin embargo, este valor aumenta notablemente en los ejemplares recolectados a la altura de la zona de confluencia con el efluente, alcanzando valores de hasta 47.000 ng g^{-1} ww; lo que demuestra la capacidad de absorción por parte de los organismos tras la puesta en contacto con el triclosán. También se recogieron otros peces, como el rutilo (*Rutilus rutilus*), el blenio vivíparo (*Zoarces viviparus*) y la perca (*Perca fluviatilis*), después de 2,5 km del punto de descarga alcanzando niveles en muestras de hasta 4.400, 900 y 440 ng g^{-1} ww, respectivamente. Entre los años 1994 y 2003, junto con el año 2008, se llevó a cabo un estudio de monitorización en el que se emplearon muestras de tejido muscular de brema (*Abramis brama*) procedentes de diferentes ríos alemanes donde se detectan niveles bastante inferiores de concentración ($3,4 \text{ ng g}^{-1}$ dw) [199]. Kim et al. [163] recogieron también muestras de tejido muscular de tres especies de peces: salmonete (*Salmo gairdneri*), mero de coral (*Epinephelus corallicola*) y mujol (*Mugil cephalus*), encontrando concentraciones de hasta 130, 157 y 278 ng g^{-1} lw.

En USA se realizaron hasta la fecha tres estudios orientados a la detección de triclosán en diferentes muestras de organismos acuáticos. En dos de las investigaciones se recogen peces provenientes de aguas de ríos tomando como muestra tejido muscular [200] y plasma [201]; sin embargo, el tercer estudio dirige la investigación más específicamente hacia organismos marinos (muestras de plasma), más exactamente delfines (*Tursiops truncatus*), procedentes de dos estuarios diferentes. Estos animales se encuentran en los niveles más altos de la cadena trófica marina y suele presentarse una correlación entre los niveles biológicos y las concentraciones medioambientales. Finalmente, las concentraciones de triclosán se encuentran comprendidas entre 0,025 y $0,270 \text{ ng g}^{-1}$ ww. Bennett et al. [202] midieron también sus niveles en orcas cautivas, alcanzando valores superiores de hasta $9,0 \text{ ng g}^{-1}$ ww. Estos últimos estudios destacan la importancia de la necesidad de monitorizar el triclosán y establecer sus efectos en especies salvajes [202].

Tabla II.5. Rango de concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{ ww}$) detectadas de triclosán en muestras de biota. (nc: no cuantificable, nd: no detectable)

PAÍS	ANIMAL	MUESTRA	ZONA	TCS (ng g^{-1})	REF.
España	peces	todo	río	nd - 1,25 ^a	[162]
USA	peces	plasma	río	0,76 - 10,26	[172,200,201]
		músculo	río	17 - 31	
	delfín	plasma	estuario	0,025 - 0,27	
Canadá	orca	plasma	acuario	9,0	[202]
Suecia	peces	bilis	río	nd - 120.000	[198]
Filipinas	peces	músculo	bahía	0,021 - 507 ^b	[163,164]
Alemania	peces	músculo	río	nd - 3,4 ^a	[199]

^a Concentración en $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$.

^b Concentración en $\text{ng g}^{-1} \text{ lw}$.

1.2 ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS

1.2.1 Definición y aplicaciones

Se estima que la aparición de las primeras sustancias fluoradas, o ampliamente conocidos como sustancias per- y poli-fluoroalquiladas (PFASs), tuvo lugar hace algo más de 50 años, más exactamente sobre el año 1947 como consecuencia del proceso de fluoración electroquímica y también como causa muy estrechamente relacionada con los procesos de telomerización [203,204]. Desde entonces y hasta la actualidad, estos compuestos han sido utilizados en un amplio rango de aplicaciones industriales como ingrediente activo, impurezas o como derivados de la degradación de algunos productos, siendo también base de un gran número de productos de consumo diario.

A lo largo de los años, estos compuestos han sido denominados de diversas formas y ha existido una gran discrepancia en cuanto a su clasificación. Recientemente, Buck et al. [204] tratan de unificar los diferentes términos empleados proporcionando una detallada clasificación de los PFASs (Figura II.1), definiendo por tanto, los compuestos per- y poli-fluoroalquilados como sustancias orgánicas antropogénicas constituidas por una cadena hidrofóbica alifática de longitud variable (normalmente, desde 4 hasta 16 átomos de carbono) que puede estar total (per-) o parcialmente (poli-) fluorada, y donde algunos de ellos (PFASs no poliméricos) presentan un grupo final hidrofílico (carboxilatos, sulfonatos, sulfonamidas, fosfonatos o alcoholes) [205].

Actualmente, los PFASs se encuentran divididos en varias categorías, entre las que se encuentran los ácidos perfluoroalquilados (PFAAs), que contienen a su vez a los ácidos perfluoro alquil sulfónicos (PFSAs) y los ácidos carboxílicos perfluorados (PFCAs) (ver Fig. II.1) [203,204]. La presente memoria se centra en aquellos compuestos con mayor impacto ambiental y mayor uso en el mercado, entre los que se encuentran: el ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS) el más destacado entre los PFSAs, y los ácidos perfluorohexanoico (PFHxA), perfluoroheptanoico (PFHpA), perfluorooctanoico (PFOA), perfluorononanoico (PFNA), perfluorodecanoico (PFDA), perfluoroundecanoico (PFUnA) y perfluorododecanoico (PFDoA), pertenecientes a los PFCAs.

En el mudo de la industria destacan sus aplicaciones como emulsificantes, surfactantes en procesos de manufactura, adhesivos, aditivos en cementos, lubricantes, espumas para combatir el fuego, repelentes de agua y aceite en la industria textil (Gore-Tex, protección para alfombras y cueros), recipientes o envases para la comida, utensilios de cocina e instrumental médico; estando también presentes en plásticos (Teflón), gasolinas, barnices, componentes inertes en pesticidas, agentes de control de adhesión en

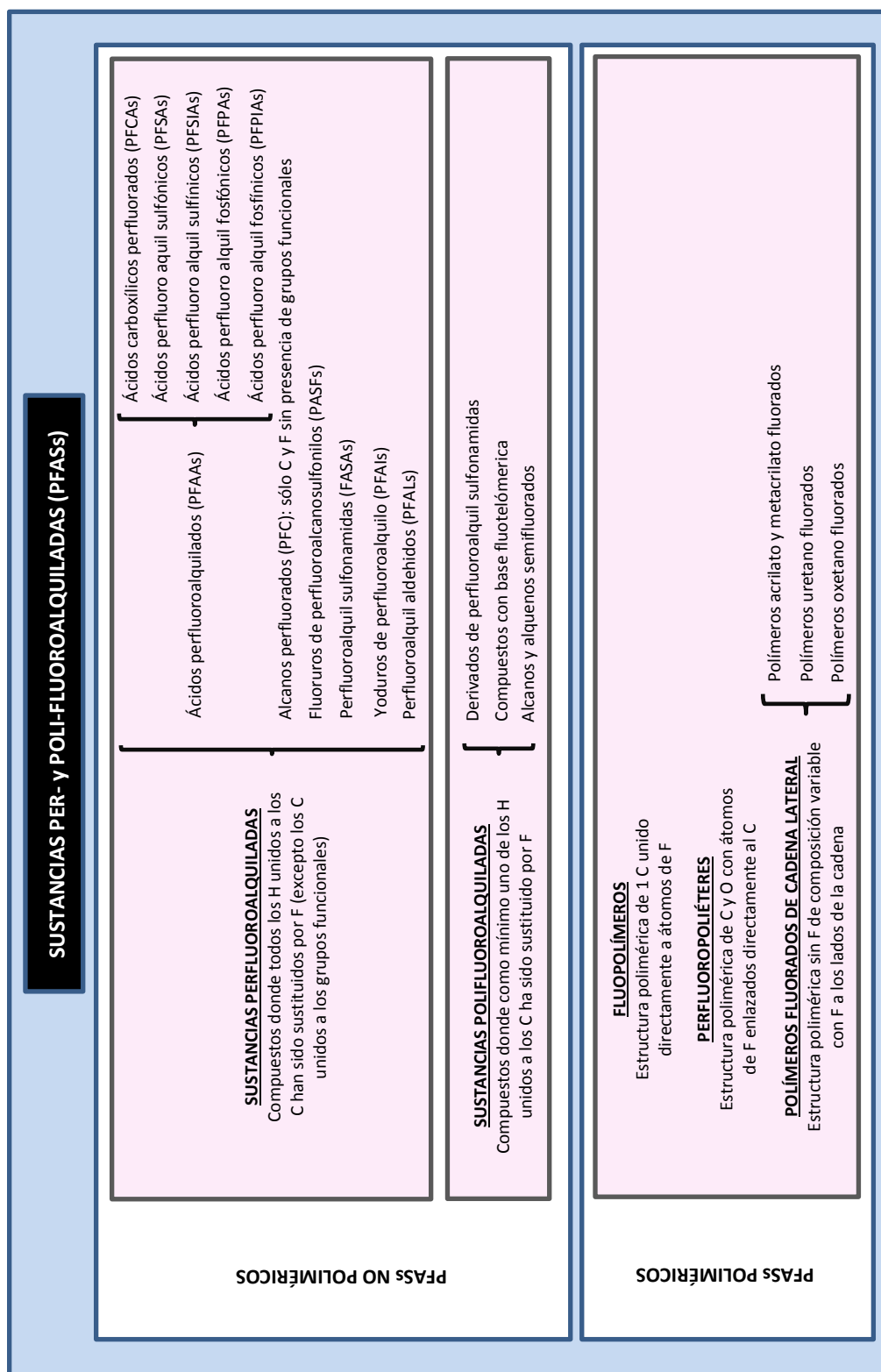


Figura II.1. Clasificación de PFASs basado en la clasificación de Buck et al. [204]

procesos fotográficos y en productos para la higiene personal y limpieza doméstica [205-209].

El extenso campo de su aplicación se debe a que se trata de una serie de sustancias químicas sintéticas con un elevado poder de repulsión tanto del agua como de aceites. Estas sustancias son medioambientalmente persistentes debido a la fortaleza inherente y a la gran estabilidad de los enlaces entre los átomos de carbono y flúor, siendo más estables química y térmicamente que los hidrocarburos análogos [8,9].

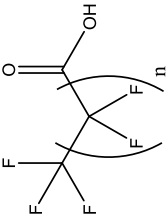
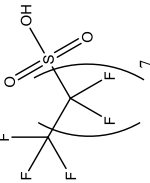
La Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) estimaba el volumen de producción histórico del PFOS y sus compuestos relacionados en 4.500 toneladas al año [210]. En base a una serie de normativas que se presentan recogidas en la Sección II.1.2.4 la producción se redujo completamente a finales del 2003 [211]. En cuanto a los PFCAs, algunos datos recogidos entre los años 1951 y 2004 presentan niveles estimados de emisiones comprendidos entre 3.200 y 7.300 toneladas [212].

1.2.2 Estructura y propiedades

En la Tabla II.6 se recogen las estructuras de los diferentes PFASs evaluados en la presente Tesis Doctoral, junto con sus correspondientes fórmulas empíricas, pesos moleculares monoisotópicos y propiedades físico-químicas más relevantes desde el punto de vista analítico. Todos los valores son experimentales recogidos en la base de datos de SciFinder Scholar [34].

Los PFAAs son compuestos orgánicos cuyos átomos de H presentes en la cadena hidrofóbica han sido sustituidos en su totalidad por átomos de F cuya fórmula general corresponde a $F(CF_2)_n-R$, donde el radical hidrofílico (-R) puede encontrarse en forma neutra o estar cargado (+/-), originando los resultantes surfactantes: catiónicos, cuando se enlazan a grupos amonio cuaternarios; aniónicos, con radicales sulfonatos ($-SO_3^-$), carboxilatos (COO^-) o fosfatos ($-OPO_3^-$); o neutros, al enlazarse a grupos -OH y $-SO_3NH_2$, debido a su carácter anfifílico. Los compuestos evaluados a lo largo de esta memoria corresponden con siete PFCAs con longitud de la cadena carbonada comprendida entre 6 y 12 átomos de carbono, con grupo funcional carboxilato (R: -COOH) y un compuesto perteneciente a la familia de los PFSAAs, con grupo funcional sulfonato (R: $-SO_3H$).

Tabla II.6. Estructura y propiedades físico-químicas de los PFASs. Datos experimentales recogidos en la base de datos SciFinder Scholar [34].

Estructura	Compuesto	CAS	Abreviatura	Fórmula empírica	Pm monoisotópico	pK _a	log K _{ow}	P _v (mm Hg)
	Ác. perfluorohexanoico	307-24-4	PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂	314,05	0,20 ± 0,10	5,970 ± 0,925	3,09
	Ác. perfluoroheptanoico	375-85-9	PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂	364,06	0,31 ± 0,10	6,859 ± 0,953	0,539
	Ác. perfluorooctanoico	335-67-1	PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	414,07	0,35 ± 0,10	7,750 ± 0,978	0,274
	Ác. perfluorononanoico	375-95-1	PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂	464,08	0,36 ± 0,10	8,638 ± 1,001	0,171
	Ác. perfluorodecanoico	335-76-2	PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂	514,08	0,37 ± 0,10	9,527 ± 1,021	0,0463
	Ác. perfluoroundecanoico	2058-94-8	PFUnA	C ₁₁ HF ₂₁ O ₂	564,09	0,37 ± 0,10	10,416 ± 1,040	0,0247
	Ác. perfluorododecanoico	307-55-1	PFDoA	C ₁₂ HF ₂₃ O ₂	614,10	0,37 ± 0,10	11,305 ± 1,058	9,40 10 ⁻³
	Ác. perfluorooctano sulfónico	1763-23-1	PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	500,13	-3,27 ± 0,50	7,032 ± 1,012	-

II. INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades más interesantes a tener en cuenta a lo largo de los estudios realizados con estos analitos es la presión de vapor, debido a la posible pérdida de algunos compuestos por volatilización, que se verá incrementada cuanto menor sea el número de átomos de carbono presentes en la cadena carbonada. Se trata de compuestos que se encuentran en forma iónica al pH natural y con solubilidad en agua variable en función de la cadena, en donde la hidrofobicidad de los PFCAs aumenta con la longitud de la cadena carbonada, de tal manera que el más hidrofílico es el PFHxA ($\log K_{ow}$ 5,97) y el más hidrofóbico el PFDoA ($\log K_{ow}$ 11,30); el PFOS tiene un valor de $\log K_{ow}$ intermedio entre el PFOA y el PFNA.

Todos los analitos presentan una acidez elevada, aunque el PFOS presenta una acidez aún mayor en comparación con el resto de compuestos a analizar. Por otro lado, la elevada energía de enlace entre los átomos de carbono y flúor le confiere a estos compuestos una gran actividad superficial, estabilidad térmica, resistencia a condiciones ácidas y alcalinas junto con una gran resistencia frente a procesos de hidrólisis, fotólisis, degradación microbiana y metabolización en animales, lo que conlleva una elevada persistencia medioambiental y poder de bioacumulación [9,213].

1.2.3 Toxicidad

Cuando se introdujeron por primera vez de forma comercial en la década de los 50, los PFASs eran considerados compuestos biológicamente inactivos y se recogían escasos o nulos informes en cuanto a su toxicidad y propiedades físico-químicas. No obstante con el paso de los años, diversas investigaciones han puesto de manifiesto la presencia de estos nuevos contaminantes organofluorados en los diferentes compartimentos ambientales, apreciando claramente una amplia distribución y persistencia de algunos de los analitos, principalmente PFOS y PFOA [214-217], llegando incluso a ser detectados en muestras de sangre humana [218-220]. A partir de entonces, numerosos científicos orientaron sus investigaciones hacia el estudio de los efectos tóxicos de estos nuevos contaminantes, en especial PFOA y PFOS, en los procesos de absorción y bioconcentración en diferentes organismos.

Actualmente, no se han establecido con certeza las diferentes vías de entrada de PFOA y PFOS en el ser humano, pese a que varios autores consideran la ingesta tanto de carne como de pescado y marisco las principales rutas de acceso [221-224]. El Comité Científico de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) presentó una estimación del consumo diario de ambos contaminantes en humanos de $60 \text{ ng kg}^{-1} \text{ bw}$ y de $2 \text{ ng kg}^{-1} \text{ bw}$

para PFOS y PFOA, respectivamente; subiendo estos valores hasta 200 ng g⁻¹ bw y 6 ng g⁻¹ bw, respectivamente, en zonas de mayor consumo de pescado [225]. Estos contaminantes son absorbidos rápidamente por el organismo tras una exposición oral [226,227] y eliminados a través de la orina y las heces, sin sufrir procesos de biodegradación ni biotransformación como consecuencia de su gran estabilidad [228]. Los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) son variados en función de la especie a analizar, siendo superiores los del PFOS [229,230] donde se alcanzan $t_{1/2}$ de hasta 5,4 años en humanos, mientras que los del PFOA son de hasta 3,8 años [231].

Los estudios de toxicidad crónica y aguda revelan la aparición de diferentes efectos adversos relacionados con la exposición de peces a estos compuestos químicos, siendo mayores al incrementar la longitud de la cadena, entre ellos afecta al desarrollo de crías cuya primera generación estuvo expuesta a PFOA y PFOS (elevando la mortalidad y generando cambios histopatológicos (en tejidos) [6]), disminución de la frecuencia cardíaca y efectos negativos sobre el movimiento tras exposición a PFOS (LC₅₀ de 2,20 mg L⁻¹) [232]; el PFOA modifica la actividad de los estrógenos en peces macho mediante la síntesis de VTG [7]. Sin embargo, la aparición de estos efectos adversos ocurren a concentraciones del orden de los mg L⁻¹, mientras que las concentraciones en el medioambiente se encuentran típicamente comprendidas entre unos pocos ng L⁻¹ y pocos µg L⁻¹.

Datos experimentales en roedores demuestran que algunos PFASs pueden llegar a acumularse en el organismo, principalmente en hígado, riñones, sangre y en menor medida en el sistema nervioso central, como resultado de una eliminación incompleta [227,233]. Como consecuencia, se han detectado diversos efectos tóxicos en el hígado (proliferación de peroxisomas [234-236], hepatomegalia [235] y disminución de peso corporal [235]), sistema inmunitario, órganos de desarrollo y reproducción, y en el sistema neuroendocrino de roedores [237,238]. El PFOA se considera un potente inmunosupresor pudiendo conllevar un aumento del número de incidencias y severidad de infecciones, y aumento de la frecuencia tumoral [239]. El PFOS afecta también a la producción de anticuerpos a niveles detectados normalmente en seres humanos [240], reduce el peso de fetos, genera hendidura en paladar, edemas, retraso de osificación de los huesos, anormalidades cardíacas y muerte en recién nacidos [241], aumento del peso del hígado en crías expuestas a través del útero [242] y modifican la regularidad del ciclo estrogénico (comportamiento como disruptor endocrino) [233].

Aunque para algunos animales los PFASs muestren efectos perjudiciales, aún no está demostrada su influencia sobre los seres humanos. Estos efectos todavía son discutibles a pesar del número de experimentos y de estudios epidemiológicos que se han realizado. La mayor parte se llevan a cabo con personas que, por causas laborales, se ven

expuestas diariamente a la presencia de determinados PFASs [243,244] y con mujeres embarazadas para determinar si existe una posible ruta de acceso hacia el feto a través de la exposición del progenitor [208]. Sin embargo, a diferencia de los efectos tóxicos encontrados en roedores, la exposición en humanos no se ha relacionado con efectos en el hígado, ni con el contenido de colesterol ni lipoproteínas [245,246], ni con cambios hormonales significativos [247]. Además, los resultados de los estudios con humanos no generan resultados concluyentes que permitan relacionarlo con certeza con la aparición de casos de cáncer [243,244].

1.2.4 Legislación

Desde comienzos del siglo XXI hasta la actualidad, tras los diversos y cuantiosos efectos toxicológicos presentados por parte de algunos PFASs (PFOS y PFOA), y después de la decisión “voluntaria” (realmente presionados por la US EPA [248]) de cese de producción por parte de la principal productora de PFASs (3M en el año 2000) [249], se han estado desarrollando numerosos informes de evaluación y medidas de gestión de riesgo por parte de diversas organizaciones nacionales e internacionales [210,250-255] donde se ponen de manifiesto los efectos perjudiciales vinculados a estos contaminantes emergentes, con el objetivo de intentar promover la creación de diferentes reglamentos y normativas que establezcan límites y recomendaciones en cuanto al uso de estos compuestos organofluorados, logrando reducir así sus impactos sobre la salud humana y el medioambiente.

En Europa, el PFOS está incluido desde el año 2006 en el Anexo I de la Directiva 2006/122/EC [256], donde se establecen las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas para limitar la comercialización y el uso de sustancias o preparados peligrosos, manteniendo como excepciones la aplicación del PFOS en la industria de la fotolitografía, fotografía, aviación y tratamientos antivaho y de galvanizado. La presente Directiva también hace referencia a la similitud del riesgo generado por el PFOA y el PFOS, prometiendo una futura revisión de las actividades en curso en el ámbito de evaluación de riesgos y disponibilidad para el uso del PFOA.

En el año 2009 se aprueba la incorporación del PFOS al Anexo B (compuestos con restricciones en su uso) de la Lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs) del Convenio de Estocolmo, junto con los fines aceptados y exenciones específicas [257]. A mediados del año 2013 y, más recientemente, a finales del 2015 se incorporan el PFOA [258] y el PFNA [259] a la lista de candidatas a “Sustancias Extremadamente Preocupantes”

(SVHC) [260], respectivamente, por ser consideradas sustancias tóxicas para la reproducción y ser persistentes, bioacumulables y tóxicas (artículos 57c y 57d del Reglamento REACH [92]). No obstante, no fue hasta mediados de 2015 y gracias a la incorporación a la Lista SVHC cuando surge la primera propuesta [261,262] de admisión del PFOA en el Anexo A de la actual Lista de POPs [263].

Actualmente en Europa no existe legislación para los PFASs, ni tan siquiera para PFOA y PFOS en alimentos, únicamente existen recomendaciones por parte de diversos organismos [264]. En el año 2006, el Comité sobre la Toxicidad (COT) recomendó una Ingesta Diaria Tolerable (TDI) para el PFOA de $3.000 \text{ ng kg}^{-1} \text{ bw}$ al día, basándose en los efectos tóxicos demostrados en hígado, riñones y sistema inmunitario [265]. El PFOS y PFOA están reconocidos como contaminantes emergentes en la cadena alimentaria por el CONTAM de la EFSA, quienes establecen valores de TDI de 150 ng kg^{-1} y $1.500 \text{ ng kg}^{-1} \text{ bw}$ al día para PFOS y PFOA, respectivamente [225].

De mayor interés para la presente Tesis Doctoral es la incorporación, en el año 2013, del PFOS a la Lista de Sustancias Prioritarias Peligrosas (Nº UE: 217-179-8) a través de la Directiva 2013/39/EU [266]; definiendo un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas para la protección de las aguas superficiales continentales, aguas de transición, aguas costeras y subterráneas, estableciendo niveles máximos de concentración en función del tipo de agua y en biota (Tabla II.7).

Tabla II.7. Normas de calidad ambiental para el PFOS en agua y biota según la Directiva 2013/39/EU [266].

	Aguas (ng L^{-1})		Biota (peces, $\text{ng g}^{-1} \text{ ww}$)
	Superficiales continentales*	Otras	
Media Anual	0,65	0,13	9,1
Concentración máxima admisible	$36 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	

* incluyen ríos y lagos y las masas de agua artificiales.

En Estados Unidos se incluyen actualmente más de 200 PFASs en la Nueva Regla Significativa del Uso (SNUR), entre los que se encuentran los PFCAs de gran tamaño de cadena (C9 - C20) y polímeros derivados del PFOS y sus homólogos [267]; con el objetivo de solicitar a los fabricantes e importadores la notificación 90 días previos a la fabricación o importación de estas sustancias para nuevos usos y actividades en las que se pretenderían

emplear estos compuestos, pudiendo así prohibir o limitar la actividad antes de que tenga lugar en el caso de que fuese necesario [268].

En Canadá, se aprobó la incorporación de PFOS, PFOA y los PFCAs de cadena larga a la Lista de Sustancias Tóxicas [269] en la cláusula 1 de la Ley Canadiense de Protección Ambiental de 1999 (CEPA) [270]. La Ley de Prohibición de Sustancias Tóxicas es la encargada de prohibir la fabricación, uso, venta o importación de sustancias o productos que contengan alguno de los compuestos contenidos en la Lista de Sustancias Tóxicas, cuya última modificación (2015) [271] incorpora el PFOA, PFOS y los PFCAs (C9 - C20).

1.2.5 Interés medioambiental

Actualmente, se reconocen dos posibles vías de entrada de los PFASs en el medio ambiente originadas, ya sea por medio de las emisiones producidas por fuentes directas o indirectas. Las primeras son el resultado de procesos de manufactura y de los diferentes usos de los PFCAs, mientras que las indirectas son aquellas en las que los PFCAs constituyen impurezas de las reacciones químicas o compuestos resultantes de los procesos de degradación de numerosas sustancias.

Dentro de las posibles fuentes indirectas, es necesario tener en cuenta que tanto los PFCAs como el PFOS son considerados compuestos poco volátiles, lo que hace improbable su distribución por vía aérea [9]. Sin embargo, eso no ha evitado su detección en zonas remotas del planeta donde no existe ningún tipo de actividad industrial [272-274]. En consecuencia, numerosos científicos han propuesto diversas hipótesis tratando de establecer explicaciones lógicas ante este comportamiento. Aunque el transporte medioambiental no está del todo estudiado, una de las principales hipótesis se encuentra vinculada a los diferentes procesos de degradación que pueden sufrir algunos de los PFASs, estando considerados algunos de ellos como los precursores de los contaminantes más persistentes (PFOA y PFOS) estudiados en la presente memoria. Tommy et al. [275] identificaron las perfluoroalquil sulfonamidas (FASAs) como unos de los compuestos precursores del PFOS. Sin embargo, tanto el PFOS como el PFOA también pueden generarse como productos de degradación microbiana de los PFCAs fabricados mediante procesos de fluoración electroquímica [276]. Por otro lado, los alcoholes fluoroteloméricos (FTOHs) sufren también procesos de degradación originando PFCAs, ya sea por medio de la oxidación atmosférica [277] o procesos bióticos [278]. Todo ello convierte al PFOS, y en menor medida al PFOA, en uno de los compuestos más extendidos en el medioambiente, lo

que coincide con la detección de concentraciones normalmente superiores a las del resto de los PFASs [9].

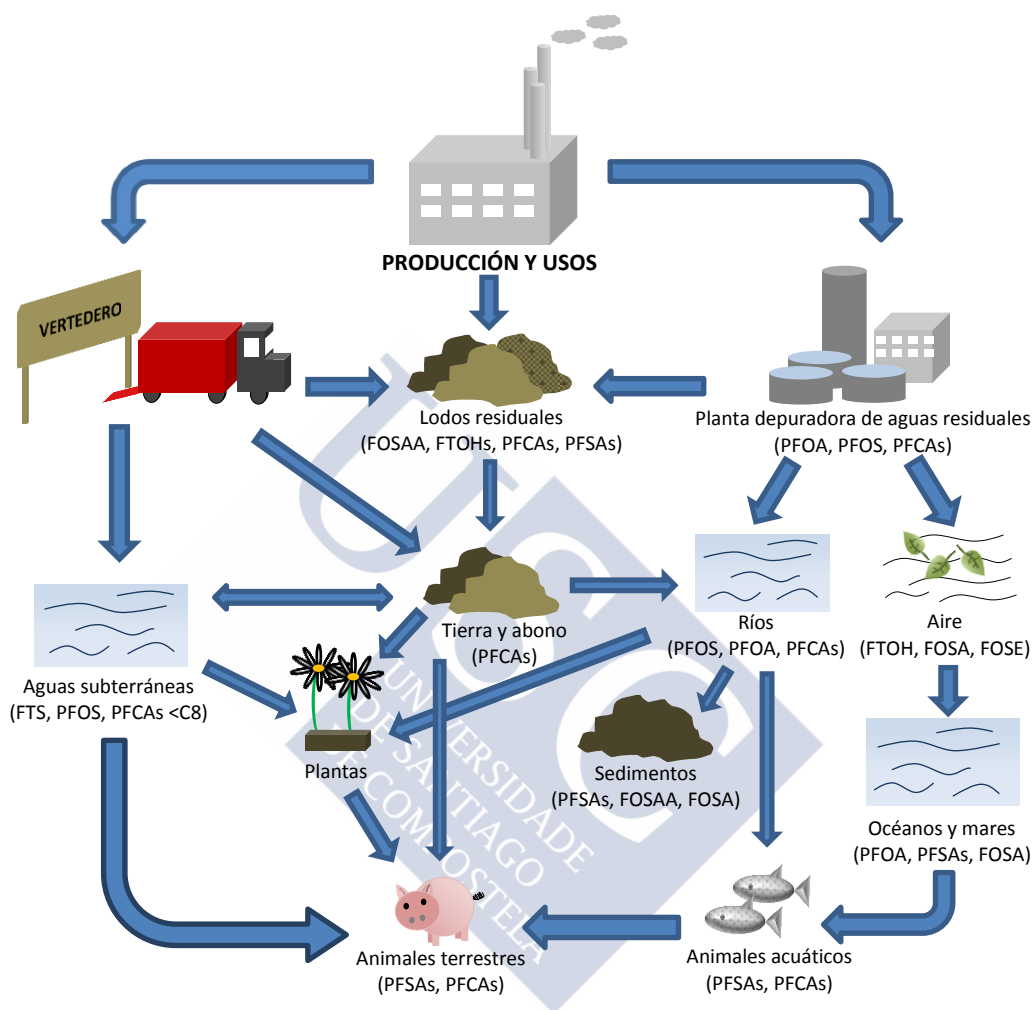


Figura II.2. Propuesta de circulación de los PFASs en el medioambiente. FTS: fluorotelómeros (basada en publicación de Hrádková et al. [279]).

Todos estos diversos focos llevan provocando desde hace varios años un aporte continuo de PFASs al medioambiente. Aunque tras el cese de la fabricación de algunos de estos compuestos ha decrecido la presencia medioambiental de los mismos, ésta sigue siendo de gran importancia. La producción y los usos de estos contaminantes, tal y como se recoge en la Figura II.2, puede conllevar a la entrada de los mismos en el medioambiente a partir de la presencia en los residuos sólidos y en los residuos acuosos que entran en las WWTP. Sin embargo, debido a su gran estabilidad química no logran ser eliminados

llegando a alcanzar tanto a la fauna como a la flora del planeta. Por ello es necesario continuar con procedimientos de control y seguimiento de los PFASs más persistentes en diferentes compartimentos ambientales, como aire, agua, biota e incluso seres humanos, y si es posible mediante el uso de técnicas de preparación de muestra más sencillas y económicas, que permitan al mismo tiempo una menor manipulación de la muestra.

Aguas

Actualmente, existen un gran número de estudios en la bibliografía en los que se recolectaron diferentes muestras de aguas localizadas en diversas partes del mundo, aunque más frecuentemente en los continentes europeo, asiático y americano (Tabla II.8). Se han efectuado investigaciones sobre diferentes clases de aguas como las provenientes de lagos [280-282], ríos [179,283-286], estuarios [217,287-290], mares y océanos [213,274,283,288,289,291-297], muestras de agua de grifo [282,298,299], e incluso precipitaciones [300-302] y aguas subterráneas [303], con la finalidad de poder relacionarlas con las diferentes formas de transporte de estos analitos.

Teniendo en cuenta que las WWTP son los principales centros de recogida de las aguas residuales industriales, se analizan frecuentemente los diversos tipos de aguas que allí se tratan, como efluentes e influentes. En base a las diferentes concentraciones detectadas en ambos tipos de aguas se puede determinar la eficacia de los procesos depurativos. En Corea, Guo et al. [304] desarrollaron un método para la detección de los analitos de interés en muestras de efluentes e influentes recolectadas en tres estaciones depuradoras con diferente procedencia de sus aguas residuales: aguas residuales domésticas, industriales y provenientes de ganadería, cada una de ellas con un proceso de tratamiento específico. No detectaron ninguno de los analitos en las aguas residuales procedentes de actividades ganaderas, sin embargo, sí niveles significativos de PFASs en las otras depuradoras. El PFOA es el analito predominante en todas ellas, ocupando un rango de concentraciones comprendido entre 2,3 y 615 ng L⁻¹ y desde 3,4 hasta 591 ng L⁻¹ para las muestras de influente y efluente, respectivamente. El PFOS fue el segundo analito dominante llegando a alcanzar niveles de 68,1 ng L⁻¹ en influente y de hasta 8,9 ng L⁻¹ en muestras de efluente. En Tailandia, Kunacheva et al. [305] estudiaron la efectividad de los tratamientos de aguas en estaciones depuradoras de aguas procedentes de actividades industriales tras el análisis de efluentes e influentes. Los resultados muestran niveles notablemente superiores a los obtenidos normalmente en aguas domésticas, llegando a alcanzar niveles de PFOS de hasta 465 ng L⁻¹ en influentes y de hasta 553 ng L⁻¹ en efluentes. Los valores de los demás analitos estudiados (C6 - C12) son algo inferiores aunque

superiores a la mayoría de los casos. Para todos los analitos la concentración antes y después de los tratamientos realizados en la depuradora es similar, lo que refleja la ineficacia de los tratamientos, observando incluso el incremento de los valores del PFOS en los efluentes, que podría ser explicado como causa de la degradación de algunos compuestos precursores. Estos estudios muestran que la actividad industrial es una de las fuentes principales de contaminación del medioambiente acuoso.

Como consecuencia de la ineficacia en algunos casos de los tratamientos llevados a cabo en las plantas residuales los PFASs logran alcanzar las aguas de los ríos, siendo detectados la mayor parte de ellos en las diferentes muestras analizadas [179,285,306-309]. Destacados son los valores detectados en aguas procedentes de ríos alemanes recogidas a lo largo del año 2006, donde se llegaron a alcanzar niveles de hasta 33.900 ng L⁻¹ de PFOA, 5.900 ng L⁻¹ de PFOS, 3.040 ng L⁻¹ de PFHxA y 989 ng L⁻¹ de PFHpA; no obstante, el resto de los analitos se encuentran a niveles no cuantificables [285]. Se detectaron también niveles elevados de PFOS en muestras procedentes de ríos italianos (1.270 ng L⁻¹) [306] y ríos japoneses (2.568 ng L⁻¹) [310], este último caracterizado por atravesar núcleos de gran población con elevada contaminación.

A través de los ríos logran su entrada en los mares, aunque en muchos casos la presencia en las aguas saladas puede ser debida a la proximidad de áreas industrializadas. Las muestras provenientes de mares y océanos son unas de las más recurridas cuando se habla de contaminación en aguas, ya que pueden constituir unas de las principales vías de entrada de los contaminantes en la cadena alimentaria de los seres humanos por medio de la adsorción o ingesta de los analitos por parte de las diversas especies que residen en él. Ahrens et al. [274] realizaron un seguimiento longitudinal y latitudinal de algunos de estos analitos en el océano Atlántico, realizando medidas desde el noroeste de Francia hasta el sur del continente africano, y desde las islas Canarias hasta zonas próximas a Nueva York. Entre los contaminantes estudiados el PFOS fue encontrado a mayores concentraciones, detectándose hasta 291 pg L⁻¹ en la zona norte del océano y disminuyendo los valores cuanto más al sur. Lo mismo ocurre para el resto de los analitos (C6 - C9) para los que se obtienen valores máximos comprendidos entre 9,7 pg L⁻¹ y 229 pg L⁻¹. El PFDoA es el único analito que no se detectó en ninguna de las áreas o divisiones estudiadas del océano. Los niveles superiores de la zona norte son comprensibles, puesto que el medio de transporte marítimo es mucho más frecuente por esas regiones, generando una posible contaminación del medio marino. Otras investigaciones realizadas puntalmente en zonas del norte o centrales del océano Atlántico muestran también niveles de concentración similares a los anteriores, tanto para PFOA como para el PFOS [213,296]. Al mismo tiempo se recogieron muestras de aguas procedentes del Pacífico cuyo resultados confirman la amplia

II. INTRODUCCIÓN

distribución de estos contaminantes en el medio acuático, presentando niveles de hasta 78 pg L^{-1} y 142 pg L^{-1} para PFOS y PFOA, respectivamente [296]. Los estudios realizados en el océano Índico son algo más escasos y se detectan niveles algo inferiores, sin superar hasta la fecha concentraciones de hasta 11 pg L^{-1} de PFOS y PFOA [294,311].

No obstante, los estudios oceánicos no son los únicos desarrollados; también se toman muestras de zonas costeras donde el grado de impacto podría llegar a ser mayor por su proximidad a los puntos de desembocaduras de ríos y a las áreas industriales. Destaca en este caso el estudio comparativo realizado en España, en el que se tomaron muestras de zonas costeras del mar Mediterráneo, zonas próximas a puertos, ríos y efluentes de plantas depuradoras. Se aprecia una clara relación entre la concentración de los analitos y el punto de muestreo, especialmente en el caso de muestras de efluente, en las que se llegan a alcanzar valores de hasta 72,1 ng L^{-1} y 61,9 ng L^{-1} para el PFOS y PFOA, respectivamente. Las muestras menos contaminadas por estos analitos son aquellas recogidas en las zonas costeras y portuarias en donde los niveles máximos detectados han sido de 8,38 y 2,25 ng L^{-1} para PFOS y PFOA, respectivamente. Dichos analitos han sido los que proporcionaron mayores valores en todas las muestras analizadas en comparación con el resto de los compuestos [283]. Se desarrolló otro estudio comparativo entre los niveles de concentración obtenidos en función del punto de recogida de muestra, para poder determinar el efecto que ejerce la proximidad a áreas industrializadas sobre la contaminación por estos analitos. Se evaluaron las costas belgas bañadas por el mar del Norte, tres zonas portuarias y un estuario, disponiendo de puntos de muestreo desde los nacimientos hasta las desembocaduras de los ríos. Únicamente se estudiaron el PFOA y el PFOS, detectándose exclusivamente este último en costas y puertos, mientras que mar adentro las concentraciones son despreciables. Cabe destacar la diferencia entre los puntos de muestreo del estuario, alcanzando concentraciones de hasta 5,2 ng L^{-1} para el PFOS en la desembocadura y valores sorprendentemente superiores en el nacimiento del río, detectándose tanto el PFOA (23,5 ng L^{-1}) como el PFOS (38,9 ng L^{-1}); niveles explicables por la presencia de áreas industrializadas próximas al nacimiento del río [288].

Pese a no ser un tipo de aguas de especial interés en la presente memoria, es necesario destacar los niveles obtenidos en aguas subterráneas próximas a áreas con elevada actividad en extinción de incendios [303]. Se alcanzaron concentraciones sorprendentes de hasta 2.300 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 6.570 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PFOS y PFOA, respectivamente; sin embargo, también se detectaron otros analitos como el PFHxA y el PFHpA con valores de hasta 372 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 149 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. En otras muestras de agua dulce, como las

Tabla II.8. Concentraciones (ng L⁻¹) de PFASs en muestras de agua. (nc: no cuantificable, nd: no detectable)

PAÍS	MUESTRA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFOS	REF.
España	efluente	nd	nc	nd - 4.320	nd - 14,1	nc - 0,037	nd	nd	nc - 72,1	[283,291,312]
	río	70	92	0,79 - 150	nc - 1,62	-	-	-	1,09 - 234	[283,284]
	mar	-	-	nc - 1,86	nc - 0,84	-	-	-	nd - 1,61	[283,291]
Alemania	influyente	-	-	1,8 - 40	-	-	-	-	nc - 85	[313]
	efluente	-	-	5,7 - 250	-	-	-	-	2,4 - 195	[313]
	río	nd - 3.040	nd - 989	nd - 33.900	nd - nc	nd - nc	nd - nc	nd - nc	nd - 5.900	[285,287,313,314]
Italia	mar	nd - 1,72	nd - 1,27	nd - 9,0	nc - 1,28	nd - 0,64	-	nd	nc - 7,93	[274,287,315]
	río	-	nd - 73	nd - 1.270	nd - 16,2	nd - 10,8	nd - 38	nd - 14,1	nd - 38,5	[179,306,316]
	río	11,3	4,5	9,4	1,3	1,1	0,1	0,1	17,4	[286]
Suiza	influyente	nd - 1,4	1,1 - 16	4,9 - 35	nd - 5,1	nd - 1,9	-	-	18 - 449	[317]
	efluente	nd - 33	0,3 - 6,3	12 - 35	nd - 0,8	nd - 2,8	-	-	16 - 303	
	río	nd	0,7 - 2,7	7 - 7,7	nd	nd	-	-	43 - 60	
China	influyente	-	nd	8,33 - 604,9	nd - 113,6	nd - 9,3	-	-	3,36	[295,318]
	efluente	-	4,96	5,51	0,88	1,66	-	-	4,09	[302]
	río	nc - 42	nd - 23,3	nd - 260	nd - 10	nd - 3,8	nd - 3,0	nd - nc	nd - 703,3	[319-322]
Tailandia	mar	nd - nc	nd - nc	nd - 320	nc - 13	nd - 0,6	-	nd - 0,001	nd - 730	[289,294,295]
	influyente	0,1 - 70	0,8 - 32,2	6,6 - 142,1	14,3 - 142,1	1,3 - 63,1	3,1 - 81,9	0,5 - 10	381,3 - 465,4	[305]
	efluente	1,0 - 84,9	1,8 - 43,5	16,9 - 149,8	21,4 - 353,2	1,8 - 81,4	3,8 - 157,7	nd - 7,6	296,2 - 552,8	

recogidas en lagos, se detectaron valores de hasta 37,6 y 6,7 ng L⁻¹ para PFOS y PFOA, respectivamente [280]. Niveles superiores se encontraron en muestras provenientes del lago Victoria detectando concentraciones de hasta 96,4 ng L⁻¹ de PFOA [281].

Para finalizar, es necesario tener en cuenta que una de las principales vías de entrada de estos analitos en los seres vivos podría deberse a la ingesta de aguas minerales sin ningún tipo de control, por ello es importante conocer también los niveles que nos podemos encontrar. Un estudio reciente determina la presencia de los mismos en aguas de grifo de los Países Bajos y Grecia, encontrando que tanto el PFOA como el PFOS han sido los analitos detectados a mayor concentración (11,1 ng L⁻¹ y 5 ng L⁻¹, respectivamente), mientras que los analitos de cadena más larga (C9 - C11) no han sido detectados en ninguna de las muestras [298]. Similar comportamiento se aprecia en muestras de grifo de Australia, donde tanto el PFOS como el PFOA han sido detectados en el 49 y 40 % de los casos, respectivamente, y los analitos de cadena larga no han sido detectados [299].

Biota

Teniendo en consideración el elevado poder de bioacumulación y las rutas de distribución de algunos PFASs, no es de extrañar que el número de estudios dirigidos a determinar la presencia y niveles de los mismos en organismos marinos se haya visto incrementado con el paso de los años (Tabla II.9). La escasez de controles y la escasa eliminación de estos contaminantes emergentes en las aguas por medio de los procesos depurativos, han sido el principal foco de entrada hacia el medio marino. Por tanto, una parte de la presente Tesis Doctoral se centrará en el análisis de dichos compuestos en las diferentes especies de bivalvos por su interés en la economía gallega.

Actualmente, existe un gran número de estudios en la bibliografía en los que se recolectaron muestras de animales marinos localizados en diversas partes del mundo, aunque más frecuentemente en los continentes europeo, asiático y americano. Algunos estudios muestran su tendencia a unirse a proteínas y a tejidos ricos en ellas, demostrándose que hígado, riñón y sangre son sus principales puntos de concentración, presentando niveles superiores a las encontradas en otros compartimentos biológicos [323-325]. En consecuencia, tanto hígado como músculo han sido las muestras más empleadas a la hora de realizar las determinaciones, aunque dependerá del tipo de investigación que se necesite efectuar.

En el continente europeo se han desarrollado un gran número de proyectos de investigación, como el llevado a cabo por Berger et al. [326], en el que se analizó la

presencia de los PFASs en un gran variedad de muestras de pescados recogidas en el lago Vättern y el mar Báltico durante el año 2001. En la mayor parte de las muestras se aprecia una presencia significativa de los analitos de cadena larga (C8 - C12) frente a los de menor tamaño que no se detectaron en ninguna de ellas. El PFOS fue el analito detectado a mayores concentraciones, llegando a alcanzar valores de hasta 23,1 ng g⁻¹ ww en la perca de río (*Perca fluviatilis*). Por otro lado, no se detectó el PFOA a niveles superiores al encontrado en el pez lota (*Lota lota*) donde se presentaron valores de hasta 0,39 ng g⁻¹ ww.

Un estudio realizado en otro país de ámbito europeo como Italia, donde se recogieron ejemplares de perca del río y farras (*Coregonis lavaretus*) recogidos en el lago Maggiore durante el año 2015, presenta niveles de PFOS en músculo de hasta 48,5 ng g⁻¹ ww, mientras que destaca la presencia de PFOA a niveles inferiores a los cuantificables [327]. Estos resultados resultan ser superiores a los encontrados ese mismo año en el lago Varese (Italia) donde los niveles de PFOS en percas de río no logran superar 17,2 ng g⁻¹ ww [328].

Sin embargo, la detección de estos contaminantes no es exclusiva de regiones próximas a desembocaduras de ríos ni a áreas industrializadas, siendo curiosamente encontrados en muestras de hígados de bacalao polar (*Boreogadus saida*) procedentes de la región ártica noruega. Con ello se confirma una acumulación claramente superior del PFOS con un valor de 117 ng g⁻¹ ww en comparación con los demás compuestos de este estudio, que no contienen cantidades superiores a 2,47 ng g⁻¹ ww correspondiente al PFNA [329].

En el continente americano, más concretamente en el sureste de Brasil (río Paraíba do Sul), Quinete et al. [330] realizaron un estudio para evaluar la presencia de PFOS y PFOA generados por la influencia de las áreas industrializadas (refinerías, plantas petroquímicas, terminales de aceite y astilleros que descargan sus efluentes directamente a la bahía) localizadas en sus proximidades, que originan la contaminación del río y de sus organismos. Se tomaron muestras de hígados y músculos de peces procedentes de ríos; delfines, peces y mejillones de las zonas costeras y salmones de una laguna próxima a la zona de mayor polución de Río de Janeiro. Gracias a los resultados extraídos se pudo confirmar la presencia de PFOS y PFOA en todas las muestras tomadas en el río Paraíba do Sul, siendo el primero el más abundante en los hígados de delfines y en el sable de plata con valores de 91 y 5,5 ng g⁻¹ ww, respectivamente. Cabe destacar que los valores de PFOS presentes en los peces de la laguna son superiores a los encontrados en la bahía y en el río. Sin embargo, los niveles de PFOA en los hígados de los peces son inferiores que los de PFOS.

Tabla II.9. Concentraciones (ng g⁻¹ ww) de PFASs en muestras de biota. (nc: no cuantificable, nd: no detectable, est.: estuario)

PAÍS	ANIMAL	MUESTRA	ZONA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDOA	PFOS	REF.
España	peces	músculo		-	nc	nd - 40	0,05 - 2,5	0,01 - 25,1	nc	-	nd - 43	[206,331]
		hígado	mar	-	-	nd - 37	-	-	-	-	nd - 83	[206]
		todo		-	-	nd	nd	-	-	-	0,54 - 1,3	[206,332]
Francia	moluscos	todo	mar	-	-	nd - 0,01	nd - 0,06	-	-	-	nd - 0,06	[206,291,332]
		hígado		nd	nd	nc	0,1	21	14	54	384	[286]
		músculo	río	nd	nd	nc	nc	3,2	2,4	10	45	
Italia	peces	hígado		-	-	nd - nc	-	-	-	-	nd - 87	
		hígado	mar	-	-	nd	-	-	-	-	nd - 940	[333]
		músculo		-	-	nd	-	-	-	-	77	
Noruega	peces	hígado		-	-	nd - 34	-	-	-	-	130 - 1.100	
		hígado	mar	nd - 5,4	0,24	nd - 1,9	nd - 2,5	nd - 0,4	nd	2,27	1,07 - 117	[329,334]
		músculo		nd	nd	nd - 0,2	nd - 0,2	nd - 0,1	nd - 0,2	nd	0,47 - 1,4	[326]
Suecia	peces	todo	mar	nd	nd - 0,01	nd - 0,02	0,02 - 0,4	0,02 - 0,3	0,05 - 0,6	nd - 0,15	0,18 - 3,3	[326,335]
			mar	-	-	-	-	-	nd - 0,6 ^a	nd - 5,8 ^a	nd - 0,2 ^a	[336,337]
		todo		2,8	0,9	nc - 11	16	-	2	0,4	nc - 33	[338,339]
China	moluscos	todo		0,96 - 53,3 ^a	nd - 10,6 ^a	nd - 111 ^a	1,1 - 7,8 ^a	nd - 2,9 ^a	nd - 1,3 ^a	nd - 1,1 ^a	nd - 4,6 ^a	[8,340]
			mar	nd - 0,4	nd - 0,5	nd - 0,48	nd	nd - 0,1	nd - 0,8	nd - 0,2	0,1 - 0,6	[341,342]
		músculo		nd	nd - 0,4	nd	nd	nd - nc	nd - 0,6	-	0,38 - 2,9	[342]
Corea	moluscos	todo	est.	0,3 - 1,0 ^a	nd - 0,2 ^a	nd - 0,2 ^a	nd	nd - 0,2 ^a	nd - 0,5 ^a	nd - 0,1 ^a	0,07 - 0,9 ^a	[290]

^a Concentración en ng g⁻¹ dw.

En USA se realizó un estudio centrado en la perca o el pez sol de orejas azules (*Lepomis macrochirus*) ya que es una especie ampliamente distribuida y comúnmente consumida por los seres humanos, haciéndola una muestra potencialmente útil para evaluar la exposición de las personas a los contaminantes acuáticos. Los peces se recogieron en ríos de la región de Minnesota y Carolina del Norte. Las concentraciones de PFOS encontradas van decreciendo a medida que la toma de muestra se efectúa en zonas más distantes a las ciudades, con valores de 89,5 ng g⁻¹ ww, 102 ng g⁻¹ ww, 47 ng g⁻¹ ww, y 47 ng g⁻¹ ww (valores de mayor a menor proximidad a ciudad); con lo que se puede destacar una reducción de la acumulación de PFOS a medida que aumenta la distancia con el foco de origen. El lago Calhoun se sitúa en la ciudad de Minnesota y es donde se encuentran los valores más destacados de PFOS con una concentración de 275 ng g⁻¹ ww. Los niveles de los demás PFASs se ven afectados del mismo modo. En Carolina del Norte el PFOS también vuelve a constituir la mayor parte de los PFASs encontrados, con rangos comprendidos entre 15,9 y 136 ng g⁻¹ ww [343].

Ya en el continente asiático, se realizó un estudio tras recoger muestras de diversos moluscos procedentes de diferentes puntos de la costa China. Se tomaron muestras enteras de 11 especies diferentes de bivalvos, entre ellos dos especies de ostras (*Crassostrea talienwhanensis* y *Amusium*), una vieira (*Chlamys farreri*), cuatro almejas (*Meretrix meretrix* Linnaeus, *Macra veneriformis*, *Macra chinensis* y *Mya arenaria*), dos especies de caracoles marinos (*Neverita dydima* y *Rapana venosa*) y un mejillón (*Mytilus edulis*). Entre los resultados obtenidos se observó que las almejas son los moluscos que presentaron mayores niveles de concentración media, principalmente de PFOA y PFOS, con niveles de hasta 31,3 y 1,24 ng g⁻¹ dw, respectivamente; llegando a alcanzar de forma puntual alguna de ellas niveles de hasta 126 ng g⁻¹ dw (PFOA). El resto de los analitos, principalmente los de cadena larga (C10 y C11) han sido detectados con menor frecuencia sin superar el valor medio de 0,64 ng g⁻¹ dw [340].

1.3 RETARDANTES DE LLAMA

1.3.1 Definición y aplicaciones

Los retardantes de llama o piroretardantes (FRs) son un grupo de compuestos químicos ampliamente utilizados desde el siglo XIX como aditivos en la industria textil y polimérica, formando parte en pinturas, termoplásticos, textiles, muebles y espumas, con la función de retrasar e inhibir la aparición del fuego y los procesos de combustión [10,11]. Estos compuestos están diseñados para incorporarse como aditivos, si no existe enlace químico entre los polímeros y los FRs, generando con el tiempo una migración del contaminante al medioambiente, o como reactivos, si existe unión química al material lo que implicaría una menor emisión al medioambiente [344]. Los FRs pueden clasificarse en tres familias principales: FRs inorgánicos, FRs organofosforados (PFRs) y FRs halogenados (HFRs), estando esta última dividida a su vez en tres categorías en función de su estructura en: aromáticos, alifáticos y cicloalifáticos [11,344]. Entre los posibles HFRs únicamente los bromados (BFRs) y clorados poseen interés comercial para ser utilizados como FRs.

Cuando los BFRs se calientan a temperaturas de combustión liberan radicales de bromo que inhiben la reacción de combustión [345]. Esta es una capacidad compartida por todos los halógenos, cuya eficiencia decrece con el tamaño del átomo ($I > Br > Cl > F$). Sin embargo, es la combinación de la gran reactividad del bromo hacia los radicales libres sumada a la fortaleza de su enlace con el carbono (que le confiere una gran estabilidad hasta temperaturas próximas a las que se inicia la combustión de diversos materiales) la que hace de muchos compuestos organobromados sustancias altamente efectivas como FRs [346]. La producción mundial total de BFRs en el año 2001 fue de aproximadamente 200.000 toneladas [347]; sin embargo, en el año 2005 este nivel alcanzó valores de hasta 311.000 toneladas, que corresponde con el 21 % del consumo total de FRs [348].

Los más empleados y la primera generación de BFRs en producirse a escala masiva son los éteres de difenilo polibromados (PBDEs o BDEs), hexabromociclododecano (HBCDs), bifenilos polibromados (PBBs) y el tetrabromobisfenol A (TBBPA) [349]. Antes del año 2010, los PBDEs eran los aditivos principales de los FRs en numerosos materiales, lo que le permitía alcanzar fácilmente distintos compartimentos ambientales [350]. Constituidos por 209 moléculas individuales que pueden clasificarse en diez grupos homólogos (Tabla II.10) y cuyas combinaciones en diferentes porcentajes constituyen las conocidas mezclas comerciales: penta-BDE (mayoritariamente constituida por BDE-47, 85, 99, 100, 153 y 154) empleada en espumas de poliuretano (colchones, muebles, almohadas) y adhesivos; octa-BDE (fundamentalmente BDE-183, 153, 154 y 197) usada en plásticos duros (acrilonitrilo

butanieno estireno (ABS)) y deca-BDEs (mayoritariamente BDE-209) usada en plásticos como poliestireno de alto impacto (HIPS) en equipos eléctricos y electrónicos [351].

Tabla II.10. Resumen de los grupos homólogos de PBDEs y de algunas de sus características.

Grupo de homólogos	Fórmula empírica	Número de isómeros	Nomenclatura IUPAC	Pm
monobromados	$C_{12}H_9BrO$	3	BDE-1 a BDE-3	170.1
dibromados	$C_{12}H_8Br_2O$	12	BDE-4 a BDE-15	327.9
tribromados	$C_{12}H_7Br_3O$	24	BDE-16 a BDE-39	405.8
tetrabromados	$C_{12}H_6Br_4O$	42	BDE-40 a BDE-81	485.7
pentabromados	$C_{12}H_5Br_5O$	46	BDE-82 a BDE-127	563.6
hexabromados	$C_{12}H_4Br_6O$	42	BDE-128 a BDE-169	643.5
heptabromados	$C_{12}H_3Br_7O$	23	BDE-170 a BDE-193	721.4
octabromados	$C_{12}H_2Br_8O$	12	BDE-194 a BDE-205	801.3
nonabromados	$C_{12}H_1Br_9O$	3	BDE-206 a BDE-208	879.3
deca-bromados	$C_{12}Br_{10}O$	1	BDE-209	959.2

Como consecuencia de las recientes normativas aplicadas desde el año 2003 sobre algunos PBDEs (Sección II.1.3.4), los elevados factores de bioacumulación y la influencia toxicológica en mamíferos (Sección II.1.3.3), fue necesario introducir en el mercado unos FRs alternativos conocidos como nuevos FRs (NFRs), pudiendo contener átomos de bromo (NBFRs) o de cloro como el Declorane Plus (DP). Los NBFRs fueron creados para reemplazar las mezclas técnicas de los BFRs, destacando en este caso el bis(2-etilhexil)-3,4,5,6-tetrabromoftalato (DEHTBP, TBHP o BEHTBP) y el 2-etilhexil-2,3,4,5-tetrabromobenzoato (EHTBB o TBB) como sustitutos de penta-BDE; el 1,2-bis(2,4,6-tribromofenoxi)etano (BTBPE) como sustituto de octa-BDE; y el decabromodifenil etano (DBDPE) y el tris(tribromoneopentil)fosfato (TTBPP) como sustitutos de deca-BDE [344,352-354].

El DEHTBP se comercializa además como plastificante para el cloruro de polivinilo (PVC) y para su uso en cables y aislamiento de cables, planchas, láminas, moquetas y adhesivos [344,354]. La producción en USA entre los años 1990 y 2006 fue de aproximadamente entre 450 y 4.500 toneladas al año [355]. La mezcla DEHTBP con EHTBB se comercializa desde el año 2003 como Firemaster 550 (relación 1:4) en sustitución del penta-BDE en las aplicaciones con espuma de poliuretano (PUF) [352]. En cuanto al EHTBB no existe información disponible en cuanto a su producción.

Producido desde mediados de 1970 y sustituto de la mezcla octa-BDE desde el 2005, el BTBPE se comercializa con el nombre de FF-680 para su uso en ABS, HIPS,

II. INTRODUCCIÓN

termoplásticos, resinas termoestables, policarbonato y aislantes [344,352]. La producción anual en USA desde 1986 y 1994 estaba comprendida entre 4.500 y 22.500 toneladas, decreciendo a partir de 1998 hasta un valor máximo de 4.500 toneladas [356]. En Europa está considerado como Producto de Bajo Volumen de Producción (LPV) pese a que la producción mundial en 2001 alcanzaba 16.710 toneladas [357]. Actualmente se estima una producción anual de 5.000 toneladas [358].

El DBDPE se produce por primera vez a mediados de 1980, comercializándose (Saytex® 2100 o Firemaster® 2100 [358]) a partir de 1990 como alternativa al deca-BDE empleándose como aditivo en diferentes materiales poliméricos (HIPS, ABS y polipropileno) y en textiles (algodón y poliéster). Europa no produce DBDPE, pero su importación en 2001 se estimó entre 1.000 y 5.000 toneladas, principalmente a Alemania [358].

El TTBPP se comercializa con el nombre de FR-370, cuya combinación estructural con alto contenido de átomos de bromo (70 %) y fósforo (3 %) contribuye a su excelente eficacia como FR [359]. La información en cuanto a la producción es más limitada, destacando su aplicación como FR aditivo en poliuretano y poliésteres insaturados [344].

El DP por su parte surge a finales de los años 60 y durante la década de los 70 como sustituto del antiguo Declorane (nombre comercial otorgado al Mirex empleado como FR aditivo) tras la prohibición de este último en USA en 1978 debido a su gran toxicidad en animales y humanos [360]. La mayor parte de las aplicaciones del DP es en la industria polimérica empleado como aislante de cables eléctricos, conectores en ordenadores y materiales de revestimiento [361]. El DP se sintetiza mediante una reacción Diels-Alder de 2 mol de hexaciclopentadieno con 1 mol de 1,5-ciclooctadieno [362], produciendo una fórmula comercial que contiene dos esteroisómeros: *syn*- y *anti*-DP, con una relación 1:3 respectivamente [363]. La producción anual estimada de DP en USA y China está comprendida entre 453 - 4.536 [364] y 300 - 1.000 [365] toneladas, respectivamente. Desde el punto de vista de las aplicaciones, el DP presenta más ventajas que los BFRs debido a su estabilidad térmica y fotoquímica, baja densidad y bajo coste [366,367]. De hecho, el DP se ha incluido recientemente en un informe de la EU como compuesto actualmente permitido para el comercio y como posible candidato para sustituir al deca-BDE en ciertas aplicaciones [368,369].

1.3.2 Estructura y propiedades

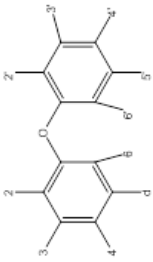
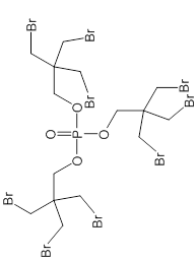
En la Tabla II.11 se recogen las estructuras de los diferentes FRs evaluados en la presente Tesis Doctoral, junto con sus correspondientes fórmulas empíricas, pesos moleculares monoisotópicos y propiedades físico-químicas más relevantes desde el punto de vista analítico. Todos los valores corresponden a valores calculados mediante *software* proporcionados por la base de datos de SciFinder Scholar [34].

Los HFRs son compuestos resistentes a ataques de ácidos y bases, y térmicamente estables. La mayor parte de los congéneres de los PBDEs son fotoresistentes, a excepción del BDE-209 para el cual la incidencia de la luz constituye una importante vía de degradación hacia congéneres de menor grado de bromación [370]. Los PBDEs son compuestos altamente lipofílicos con valores de $\log K_{ow}$ comprendidos entre aproximadamente 6 y 10 unidades, con una solubilidad en agua bastante baja que disminuye al aumentar el grado de bromación de la estructura. Su apolaridad y baja-moderada volatilidad limita las probabilidades de transporte por agua y aire al medioambiente.

Por otro lado, los NFRs presentan valores de $\log K_{ow}$ similares o ligeramente superiores (DBDPEy DP), lo que implica una mayor hidrofobicidad que se ve reflejada en los valores de solubilidad en agua. En comparación con los valores de la presión de vapor de los PBDEs, los NFRs presentan una menor volatilidad dificultando todavía más su transporte atmosférico. Pese a que los valores recogidos en la Tabla II.11 son calculados mediante *software*, también se puede obtener información en cuanto a las propiedades físico-químicas viendo la similitud estructural que existe, por ejemplo, entre el DBDPE y el BDE-209. La presencia del puente de etano entre los dos anillos aromáticos le confiere al DBDPE, aunque de forma ligera, una mayor hidrofobicidad que el BDE-209.

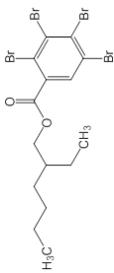
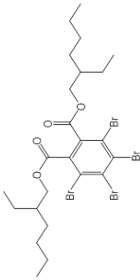
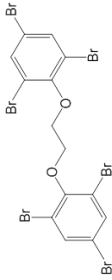
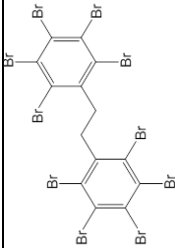
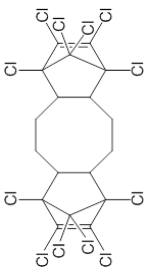
Una vez liberados al medioambiente todos estos compuestos exhiben una gran persistencia y un elevado poder de bioacumulación [12].

Tabla II.11. Estructura y propiedades físico-químicas de los FRs estudiados. Datos calculados mediante *software* proporcionados por la base de datos SciFinder Scholar [34].

Estructura	Compuesto	CAS	Abrev.	Fórmula empírica	Pm monoisotópico	log K _{ow}	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	P _v (mm Hg)
	2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter	5436-43-1	BDE-47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	485,8	6,68	0,25 10 ⁻²	4,2 10 ⁻⁶
	2,2',3,4,4'-pentabromodifenil éter	182346-21-0	BDE-85	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564,7	7,10	7,3 10 ⁻²	1,7 10 ⁻⁷
	2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter	60348-60-9	BDE-99	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564,7	7,31	6,20 10 ⁻²	2,6 10 ⁻⁷
	2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter	189084-64-8	BDE-100	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	564,7	7,10	0,73 10 ⁻³	9,6 10 ⁻⁷
	2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter	68631-49-2	BDE-153	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643,4	7,93	0,16 10 ⁻³	1,4 10 ⁻⁸
	2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter	207122-15-4	BDE-154	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	643,4	7,73	0,19 10 ⁻³	5,7 10 ⁻⁸
	2,2',3,4,4',5',6-heptaabromodifenil éter	207122-16-5	BDE-183	C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	722,5	8,18	0,56 10 ⁻⁴	2,7 10 ⁻⁹
	2,2',3,3',4,4',6,6-octaabromodifenil éter	117964-21-3	BDE-197	C ₁₂ H ₂ Br ₈ O	801,4	8,44	0,19 10 ⁻⁴	5,2 10 ⁻¹⁰
	decabromodifenil éter	1163-19-5	BDE-209	C ₁₂ Br ₁₀ O	949,2	9,45	1,4 10 ⁻⁴	1,6 10 ⁻¹²
	tris(tribromoneopentil)fosfato	19186-97-1	TTBPP	C ₁₅ H ₂₄ Br ₉ O ₄ P	1.018,5	7,55	0,8 10 ⁻⁴	1,1 10 ⁻¹⁹

Abrev.: abreviatura.

Tabla II.11. Continuación.

Estructura	Compuesto	CAS	Abrev.	Fórmula empírica	Pm monoisotópico	log K _{ow}	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	P _v (mm Hg)
	2-etilhexil-2,3,4,5-tetrabromobenzoato	183658-27-7	EHTBB	C ₁₅ H ₁₈ Br ₄ O ₂	549,9	7,28	0,16	2,8 10 ⁻⁹
	bis(2-etilhexil)-3,4,5,6-tetrabromofthalato	26040-51-7	DEHTBP	C ₂₄ H ₃₄ Br ₄ O ₄	706,1	9,34	0,33 10 ⁻⁴	1,2 10 ⁻¹³
	1,2-bis(2,4,6-tribromofenoxi)etano	37853-59-1	BTBPE	C ₁₄ H ₈ Br ₆ O ₂	687,6	8,31	0,16 10 ⁻³	2,9 10 ⁻¹²
	decabromodifenil etano	84852-53-9	DBDPE	C ₁₄ H ₄ Br ₁₀	971,2	11,68	0,95 10 ⁻⁶	2,2 10 ⁻¹⁷
	Declorane Plus	13560-89-9	DP	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₁₂	653,7	10,12	0,40 10 ⁻⁶	1,0 10 ⁻¹³

1.3.3 Toxicidad

Entre las tres mezclas comerciales disponibles de PBDEs en su momento, los congéneres de menor grado de bromación, es decir los que constituyen la mezcla comercial penta-BDE, son los que parecen exhibir una mayor toxicidad. De un modo más concreto, entre los estudios desarrollados con mamíferos, principalmente con roedores, la mezcla penta-BDE ha sido relacionada con la neurotoxicidad y alteraciones de las hormonas tiroideas, la octa-BDE ha sido relacionada con teratogénesis y toxicidad fetal, mientras que la deca-BDE parece afectar negativamente a la morfología del tiroides, del hígado y del riñón [13-18].

Pese a ser la deca-BDE la mezcla que exhibe la menor toxicidad de todas, en parte debido al gran tamaño molecular del BDE-209 que dificulta su transporte a través de membranas celulares [371], el potencial pernicioso de la misma no debería ignorarse. Así, y en contraposición a la defendida inocuidad y gran estabilidad en el medioambiente de la deca-BDE, inicialmente argumentadas por la industria fabricante y parte de la comunidad científica, y defendidas hasta tiempos muy recientes, diversas investigaciones han sugerido la posible degradación medioambiental del BDE-209 en congéneres de menor grado de bromación pero de mayor biodisponibilidad, capacidad de bioacumulación y potencial tóxico, por vía fotolítica [372,373] y acción microbiana [374,375]. Así mismo, estudios *in vivo* han revelado la metabolización del BDE-209 en congéneres hexa-, hepta-, octa- y nona-bromosustituidos en peces [376], vacas [377] y ratas [378].

Aunque menos numerosos, también se han realizado y se continúan realizando estudios de toxicidad sobre los NFRs tras establecerse como sustitutos de las mezclas comerciales, principalmente sobre DP, el DBDPE y el BTBPE, realizando, al igual que con los PBDES, la mayor parte de ellos en roedores.

Evaluando de forma particular cada uno de los NFRs, se confirma una baja toxicidad del DBDPE en ratas apreciándose ligeras variaciones en el peso del hígado y ligeros efectos histomorfológicos (dosis letal media (LD_{50}) superiores a $5.000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw}$) [379,380]. Se trata de un compuesto biodegradable con bajo poder de bioconcentración en peces (factor de bioconcentración (BCF) < 25) [381], aunque con un elevado poder de biomagnificación (factor de biomagnificación (BMF) 0,2 - 0,92), llegando a alcanzar BMF de hasta 9,2 en los puestos más altos de la cadena trófica [382]. La similitud estructural con el BDE-209 hace que muchos investigadores le otorguen sus mismos resultados toxicológicos: modificación del aprendizaje y del comportamiento de animales [383,384]. Por otro lado, la presencia del puente de etano entre los dos anillos le confiere, aunque ligeramente, una

mayor hidrofobicidad y flexibilidad que al BDE-209 [385], reduciendo su potencial para producir dioxinas o furanos bajo condiciones de pirólisis [386].

Según la información ofrecida por OxyChem (fabricante del DP), el DP presenta efectos ecotoxicológicos en peces y otros organismos, observando disminución del tamaño del hígado y del peso de los ovarios en conejos [387]; aunque también se estudian los efectos sobre la citotoxicidad, expresión del ácido ribonucleico mitocondrial [388], y la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro del *anti*-DP en peces [389]. En general, el DP ha demostrado presentar muy baja toxicidad en peces [387,390] y ratas [390]. Los estudios realizados por OxyChem sugieren que es susceptible de degradación microbiana aeróbica, pero no menciona específicamente cuál de sus isómeros lo hace en mayor grado [387]. Sin embargo, De la Torre et al. [391] comprueban una mayor influencia de degradación microbiana sobre el *anti*-DP, lo que origina el enriquecimiento de *syn*-DP en lodos. El tiempo de vida medio de fotodegradación es de aproximadamente 24 años, por lo que se considera un compuesto bastante persistente en el medioambiente [392]. Al igual que con la degradación aeróbica, el *anti*-DP es degradado más rápidamente bajo la acción de la luz UV ($\lambda \geq 365$ nm), lo que conlleva a una degradación estereoselectiva durante el transporte atmosférico [393].

El BTBPE muestra una toxicidad aguda débil en ratas y perros ($LD_{50} > 10 \text{ g kg}^{-1} \text{ bw}$) [380,394], generando efectos gastrointestinales, dermatitis y cambios en el comportamiento y tras pocas semanas efectos sobre los pulmones, tórax, o la respiración [380]. Otros autores asocian también la presencia de este compuesto con fuertes cambios metabólicos y nutritivos en conejos ($LD > 10 \text{ g kg}^{-1} \text{ bw}$) [380]. Un estudio metabólico efectuado durante un día confirma la excreción en las heces (99 %) y orina (1 %); sin embargo, una exposición prolongada conlleva una acumulación en el tejido adiposo, seguido de riñones y piel, con poca o escasa presencia en el cerebro [394]. Presenta $t_{1/2}$ de 54,1 días y BFM de 2,3 en truchas [395]. Es estructuralmente similar al DBDPE y al deca-BDE, por lo que puede seguir su misma ruta de debromación. A temperaturas elevadas (340 °C) tiene lugar la ruptura de sus enlaces, originando dos productos de descomposición identificados como disruptores endocrinos: 2,4,6-tribromofenol y éter vinil tribromofenol [396].

Hasta la fecha, apenas existe información toxicológica de los otros NFRs (DEHTBP, EHTBB y TTBPP). Existe una gran similitud estructural entre el DEHTBP y el EHTBB, a excepción de la ausencia del segundo grupo éster en el último de ellos. Ambos compuestos pueden sufrir procesos de fotodegradación, debromándose secuencialmente hasta alcanzar productos de degradación no bromados como el di(etilhexil)ftalato (DEHP), en el caso del

DEHTBP, relacionado con desarrollo de cáncer y aparición de efectos tóxicos en el desarrollo y la reproducción [397,398].

1.3.4 Legislación

A partir del siglo XXI, como consecuencia de la amplia distribución en el medioambiente y de los diversos efectos toxicológicos demostrados en diferentes seres vivos, surgen las primeras normativas y recomendaciones de las distintas mezclas técnicas en diferentes países con el objetivo de reducir el riesgo sobre los seres humanos y el medioambiente. En los años 2000 y 2002, el Comité Científico de la Toxicidad, la Ecotoxicidad y el Medioambiente (CCTEMA) evaluaron los riesgos medioambientales de las mezclas penta- y octa-BDE, observando la necesidad de reducir dichos riesgos y destacando la preocupación por los crecientes niveles de penta-BDE en la leche materna. Tras estas conclusiones, el Parlamento Europeo y el Consejo aprobaron la Directiva 2003/11/EC [399] que limita la comercialización y el uso de ambas mezclas, así como los productos que puedan contenerlos hasta un máximo del 0,1 % en masa desde el año 2004, pese a no estar reconocidos en ese momento como compuestos persistentes, bioacumulativos y tóxicos (PBT) por la US EPA o *Environment Canada* [400]. En USA la producción de estas dos mezclas técnicas cesó voluntariamente a finales del año 2005 [401], constituyendo en ese momento la deca-BDE un 80 % de la producción global de PBDEs [402].

A comienzos del año 2003, se publica en Europa la Directiva 2002/95/EC (Directiva RoHS) sobre las restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas, para las que se establece Julio del 2006 como fecha límite para la retirada de las mezclas penta- y octa-BDEs de los nuevos aparatos eléctricos y electrónicos que se pongan en el mercado [403]. Sin embargo dos años más tarde, se publica una modificación de la misma (2005/717/EC [404]) para la adaptación al progreso técnico, en la que exime de la prohibición a los PBDEs por no ser posible llevar a la práctica, en ese momento, la eliminación o sustitución de estas sustancias de los componentes especificados. En esa misma modificación solicitan posteriores estudios de la deca-BDE; sin embargo, no fue hasta el año 2008 cuando entra a formar parte de la misma, prohibiendo su uso en materiales eléctricos [405]. Esta prohibición se aplica para los componentes de este tipo que se fabrican o se importan en Europa, sin embargo, el uso de esta mezcla está permitido en otro tipo de aplicaciones. En Mayo del 2009, las mezclas penta- y octa-BDEs fueron incluidas en la *Priority List* establecida en el Convenio de Estocolmo sobre POPs entre los que se incluyen los tetra-, penta-, hexa- y hepta-BDEs [406].

Fuera de la EU, los organismos *Environment Canada* y *Health Canada* publican en el año 2006 la Estrategia de Gestión de Riesgos con el objetivo de reducir al máximo los niveles de PBDEs en el medioambiente canadiense [407]. En el 2008, el gobierno de Canadá publica una serie de normativas (SOR 2008-218 [408]) en las se prohíbe la producción de los congéneres tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona- y deca-BDEs, y el uso, venta e importación de los tetra-, penta- y hexa-BDEs, al igual que sus mezclas, polímeros y resinas que contengan esas sustancias.

Actualmente, no existen leyes o normativas establecidas para los NFRs que restrinjan o limiten su uso. Únicamente existe clasificación de estos compuestos en función del volumen de producción, siendo considerado el DP como sustancia de Elevado Volumen de Producción (HPV) por la US EPA [409], mientras que en Europa se considera, junto con el BTBPE [410], sustancias LPV [411]. El DP se encuentra incluido en la Lista de Sustancias Domésticas de Canadá (DSL) [412].

1.3.5 Interés medioambiental

Al igual que el resto de familias de contaminantes, numerosos estudios señalan a las WWTP como la principal ruta de entrada de los POPs en el medioambiente, puesto que se consideran el punto de reunión de los desechos provenientes tanto de domicilios como de plantas industriales [413]. De acuerdo con lo recogido anteriormente, los FRs se encuentran presentes en una gran variedad de productos de los que son capaces de abandonar su estructura encontrando salida al medioambiente, en particular a través de las WWTP, donde debido a su naturaleza lipofílica los FRs orgánicos están predispuestos a retenerse en el contenido lipídico de los lodos de depuradoras empleados posteriormente con fines agrícolas, permitiendo de este modo su incorporación a los suelos [391].

Las características intrínsecas de los PBDEs, incluyendo apolaridad y baja volatilidad, limitan las probabilidades de transporte por agua y aire al medioambiente. Sin embargo, estos compuestos pueden ser desplazados a través de esas vías tras absorberse por aerosoles y sedimentos en suspensión, que en este caso sí son transportados por el aire, agua y también en los organismos. Además, debido a su elevada afinidad por lípidos y proteínas es común encontrarlos en elevadas cantidades en biota [345].

La aparición en el mercado de los NFRs y su incorporación como sustitutos de los PBDEs conlleva un incremento de la presencia medioambiental de los mismos. Es más, los estudios realizados durante la última década centran sus investigaciones en determinar la presencia tanto de los PBDEs, todavía encontrados en altas cantidades, como de los NFRs

en diferentes tipos de matrices a lo largo del planeta, en sedimentos [414-418], lodos [391,419], biota [420-422], peces [423-426], agua [424,427], aire [428-430], polvo [431-434], leche materna [435,436], sangre [436,437] o juguetes [438].

Aguas

Los bajos valores de solubilidad en agua y el comportamiento lipofílico característicos de estos compuestos dificultan su detección en las muestras acuosas, lo que coincide con el escaso número de estudios encontrados para este tipo de matrices frente a los desarrollados para muestras sólidas (normalmente muestras con alto contenido lipídico). Ciertamente es que la principal ruta de entrada de los FRs es a través de los efluentes procedentes de las plantas industriales en las que se generan o se emplean grandes cantidades de estos contaminantes. Estos residuos suelen pasar por la correspondiente WWTP, sin embargo, tal y como se comentó a lo largo de la Sección II.1.3.3, no se logra una total eliminación de los mismos sino la debromación hacia congéneres de menor tamaño, pudiendo por tanto alcanzar tanto ríos como aguas continentales, quedándose en la mayor parte de los casos retenidos en sedimentos o en la biota expuesta a ellos. En la Tabla II.12 y Tabla II.13 se recogen las concentraciones detectadas de PBDEs y NFRs encontradas en muestras de aguas, respectivamente.

Normalmente, los niveles más altos detectados de PBDEs suelen encontrarse en las aguas residuales contaminadas [439,440], efluentes industriales [441] y ríos [442] próximos a las áreas industriales donde tiene o haya tenido lugar algún tipo de vertido. Wang et al. [441] desarrollaron un método de microextracción en fase sólida con multicapas de nanotubos de carbono como fase estacionaria para la determinación de cinco PBDEs (BDE-47, 99, 100, 153 y 154) a partir de muestras de un río local y un efluente industrial proveniente de una fábrica de plásticos. Los resultados muestran una gran influencia de la proximidad a áreas industriales, alcanzando valores comprendidos entre 134 y 215 ng L⁻¹ en la muestra de efluente, mientras que en el río los niveles son inferiores a los límites de detección (LODs). También se pueden encontrar niveles altos de FRs en muestras donde la probabilidad de detección suele ser escasa, es el caso de aguas superficiales donde en condiciones normales los niveles de estos contaminantes suelen ser nulos [443-447]; sin embargo, estos niveles pueden aumentar considerablemente (hasta 82 ng L⁻¹) al ser punto de vertidos de efluentes [442].

Tabla II.12. Concentraciones (ng L⁻¹) de PBDEs en muestras de agua. (nc: no cuantificable, nd: no detectable)

PAÍS	MUESTRA	BDE-47	BDE-85	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	BDE-183	BDE-197	BDE-209	REF.
España	superficial	15 - 82	15 - 82	15 - 82	82	15	nd	-	-	-	[442]
	mar	nd - 12,2	nd - 223	2,6 - 5,4	15 - 36	nd - 17,3	nd - 24,2	-	-	-	[448,449]
	estuario	nd	160 - 201	nd - 123	37 - 90	nd	nd	-	-	-	[448]
Portugal	influyente	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	[450]
Francia	río	0,02-0,04	-	0,01-0,04	0,004-0,006	0,007-0,008	0,004-0,005	0,003-0,01	-	0,77-1,66	[451]
Eslovenia	mar	nd	-	nd-0,125	nd-0,19	nd-0,34	nd-0,23	-	-	-	[452]
Noruega	hielo	nd	nd-0,008	nd	nd	nd	nd	nd-0,006	-	0,33-6,95	[453]
	influyente	nd - 64,3	-	nd - 17,5	nd - 13,6	nd - 7,8	nd	nd	-	-	[439,444, 454]
	efluente	134	-	155	147	212	215	-	-	-	[441]
China	río	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	[441,443, 444,446]
	mar	nd - 0,003	nd	nd - 0,0002	nd - 0,006	nd	nd	-	-	nd - 0,002	[455]
Argentina	río	nd - 1,9	-	nd - 0,3	nd - 0,5	nd - 0,6	-	-	-	-	[456]
USA	estuario	nc - 0,18	nc - 0,002	nc - 0,91	nc - 0,02	nc - 0,01	nc - 0,01	nc - 0,03	-	nd - 0,19	[457]

Tabla II.13. Concentraciones (ng L^{-1}) de NFRs en muestras de agua. (nc: no cuantificable, nd: no detectable)

PAÍS	AÑO	MUESTRA	EHTBB	DEHTBP	BTBPE	TTBPP	DBDPE	syn-DP	anti-DP	REF.
Alemania	2010	mar	-	-	-	-	-	nd-0,00086	nd-0,00038	[455]
	2011	mar	nd-nc	-	-	-	-	-	-	[458]
Noruega	2010	hielo	-	-	nd-0,09219	-	nd-0,07444	-	-	[453]
USA	2011	lluvia	-	-	-	-	-	0,03-0,23	0,06-0,70	[459]
Canadá	2006	lago	-	-	nd-0,00269	-	nd	-	-	[382]
		estanque	-	-	0,02	-	nd	-	-	[460]
2010		estanque	-	-	-	-	-	0,27	0,53	[461]
		río	-	-	-	-	-	nd-2,40	-	[462]
China		río	-	-	-	-	-	nd	nd	[445]
	2011	mar	-	-	-	-	-	nd-1,5	nd-3,6	[463]
		mar	-	nd-0,00022	nd-0,00088	-	-	nd-0,00022	nd-0,00014	[455]
2013		efluente	-	-	-	-	-	0,3	0,3	[464]
		río	-	-	-	-	-	0,2	0,2	

En otro tipo de muestras como agua de mar, el número de estudios realizados disminuye notablemente teniendo en cuenta la dilución de las concentraciones; sin embargo, es importante destacar que se trata del punto donde confluyen los diferentes tipos de aguas, y en algunos casos la proximidad a áreas industrializadas situadas en zonas costeras puede afectar seriamente a los resultados. Los niveles de PBDEs encontrados no suelen ser superiores a los $0,34 \text{ ng L}^{-1}$ (BDE-153) [452,455]; sin embargo, destacan los niveles encontrados por Prieto et al. [448,449] en dos investigaciones realizadas en la costa norte de España, en las que se llegan a alcanzar niveles de hasta 223 ng L^{-1} (BDE-85).

Es cierto que tras introducirse como sustitutos de los PBDEs, los NFRs han recibido una mayor atención durante estos últimos años, sin embargo, el número de estudios desarrollados para determinar su presencia en muestras acuosas continúa siendo bastante escaso. Entre los diferentes compuestos evaluados en la presente Tesis Doctoral, parece que los isómeros del DP han sido los más estudiados y los detectados con mayor frecuencia [393,455,459,461-464], encontrando niveles de hasta $3,6$ y $1,5 \text{ ng L}^{-1}$ para el *anti*-DP y *syn*-DP, respectivamente [463]. El estudio realizado por Qi et al. [462] permite demostrar también la influencia de la proximidad a zonas más industrializadas o más habitadas a partir de las concentraciones de DP (entendido en este caso como la suma de ambos isómeros) encontradas en aguas de río, tomadas a tres diferentes alturas, una en zona rural donde las concentraciones no superan los $0,23 \text{ ng L}^{-1}$, en un punto intermedio del recorrido del río con concentraciones algo superiores de hasta $1,20 \text{ ng L}^{-1}$, y alcanzando los niveles máximos en zonas urbanas con niveles de hasta $2,40 \text{ ng L}^{-1}$.

En cuanto a los otros NFRs, el número de estudios ha sido mucho menor, destacando que hasta la fecha no se había realizado ningún estudio para determinar la presencia del TTBPP en muestras de agua. El EHTBB, el DEHTBP y el DBDPE fueron determinados en un par de casos, encontrándose para el primero de ellos niveles inferiores al LOQ en agua de mar [458], para el segundo niveles de hasta $0,00022 \text{ ng L}^{-1}$ en mar [455], y el tercero valores de hasta $0,074 \text{ ng L}^{-1}$ en muestras de hielo [453]. Por el contrario, el BTBPE se ha determinado en un par de ocasiones más [382,453,455,460], alcanzando los niveles más altos en muestras de hielo con concentraciones de hasta $0,092 \text{ ng L}^{-1}$ [453].

Biota

De acuerdo con lo recogido anteriormente, la probabilidad de detectar FRs en organismos o animales marinos es muy elevada, superior a las otras familias recogidas en la presente memoria, como consecuencia de su baja solubilidad en agua y su elevada

II. INTRODUCCIÓN

lipofilicidad. A diferencia de las investigaciones realizadas en matrices acuosas, el número de estudios realizados en biota es muy superior, detectando tanto los clásicos PBDEs como los NFRs en la mayor parte de los casos, aunque los PBDEs han sido y continúan siendo, frente a los NFRs, los más estudiados y los detectados con mayor frecuencia. La Tabla II.14 y Tabla II.15 recogen las concentraciones de algunos de los estudios realizados donde se detectó la presencia de PBDEs y NFRs en muestras de biota, respectivamente.

Del mismo modo que para los PFASs, estas investigaciones se han realizado principalmente a lo largo de los continentes asiático, americano y europeo, siendo China el país donde se realizaron la mayor parte de ellos, seguido de Canadá, Noruega, España, Dinamarca y USA. Han sido varios los organismos marinos estudiados durante estos años, desde zooplancton hasta animales situados en los niveles más altos de la cadena trófica. A diferencia de los otros contaminantes de interés, los FRs han sido determinados con mayor frecuencia en muestras de moluscos, como mejillones [336,382,420,421,426,457,465-473], almejas [421,457,468,474,475], berberechos [468] u ostras [457,463,470], aunque también en diferentes especies de peces [201,422,423,476-480]. En el caso de moluscos o crustáceos suele emplearse como muestra todo el ejemplar (exceptuando la concha o cáscara); sin embargo, en peces u otros organismos marinos suelen ser muestras de hígado, músculo o grasa (esta última en los animales de mayor tamaño como delfines, ballenas o focas [466,474,480-485]), aunque en contadas ocasiones se han seleccionado otras como plasma, cerebro, corazón, riñones, páncreas... [201,389,486].

Entre los diferentes estudios realizados para determinar la presencia de FRs en moluscos, pueden encontrarse aquellos destinados a la detección exclusiva de PBDEs [420,421,426,457,465,466,468-475], de NFRs [463,467] o de ambos [336,487]. Los trabajos con muestras de moluscos han sido predominantes del continente europeo entre los que destaca el estudio realizado por Poma et al. [465] donde tratan de determinar la presencia de los PBDEs de mayor grado de bromación (BDE-179, 188, 201, 202, 206-209), detectando niveles de hasta $144,7 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$ para el BDE-209 en mejillones zebra (*Dreissena polymorpha*) procedentes de lagos italianos. Oros et al. [457] detectaron niveles elevados para los PBDEs de menor tamaño, principalmente BDE-47, 85, 99 y 100 a partir de muestras de mejillones (*Mytilus californianus*), ostras (*Crassostrea gigas*) y almejas (*Corbicula fluminea*) procedentes de un estuario canadiense, donde se registraron concentraciones de hasta 28, 43 y $60 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ para el BDE-47, respectivamente. A diferencia de estas especies de moluscos, apenas han sido detectados los PBDEs o los NFRs en muestras de berberechos [468,488].

En cuanto a la presencia de los NFRs en moluscos, la mayor parte de los trabajos se encuentran enfocados a la determinación de algunos de ellos, principalmente los dos

isómeros del DP y en menor medida el DBDPE y el BTBPE; sin embargo, otros como EHTBB, DEHTBP y TTBPP apenas han sido estudiados. Destacan algunas investigaciones como la desarrollada por Dooder et al. [336] en la que se estudia la presencia de varios tipos de contaminantes en mejillones (*Mytilus spp.*) a lo largo de la costa de California, incluidos varios PBDEs (entre ellos BDE-47, 99, 100, 153, 154, 183 y 209) y algún NFRs (como el BTBPE). Se detectaron todos los PBDEs a excepción del BDE-209, alcanzando para los demás concentraciones de hasta $68 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ para el BDE-47, y niveles de BTBPE comprendidos entre $0,21$ y $2 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$. Jia et al. [463] estudiaron las concentraciones y la bioacumulación de los compuestos del DP (incluyendo ambos isómeros) en las costas del norte de China, incluyendo su presencia en muestras de ostras, encontrándose niveles en el bivalvo de hasta $8,1$ y $11 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ para *syn*- y *anti*-DP, respectivamente. Tomy et al. [467] estudiaron además de la presencia del DP, la del BTBPE, alcanzando valores de hasta $1.300 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$ para este último en muestras de mejillones procedentes de un lago canadiense. Law et al. [487] fueron los únicos que trataron de determinar la presencia del DBDPE junto con el BTBPE, sin lograr detectar niveles para el primero de ellos superiores al LOD.

Al igual que para la detección en moluscos, la determinación de los FRs de interés en peces u otros animales marinos también se ha efectuado exclusivamente para PBDEs [201,334,422,423,426,466,473-485,488-500], para los NFRs [389,425,460,461,467,486,501,502] o para ambos grupos de compuestos [367,382,503,504]. Tal y como se comentó anteriormente, la mayor parte de los estudios realizados con peces suelen emplear muestras de hígado y músculo para la determinación de los contaminantes; sin embargo, las concentraciones más elevadas suelen encontrarse en el primero de ellos, alcanzando en algunos casos niveles de hasta mil veces más, como ocurre con las muestras de faneca (*Trisopterus luscus*) procedentes de un estuario belga, donde se detectaron niveles en músculo comprendidos entre $0,27$ y $0,47 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ aumentando hasta concentraciones en un rango desde 107 hasta $544 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ en hígado para el BDE-47 [422]. No obstante, no es el único estudio que refleja esta diferencia entre ambos tipos de muestra; Vives et al. [423] realizaron un procedimiento similar para determinar la diferencia entre las concentraciones presentadas a partir de diferentes ejemplares de truchas procedentes de diversos lagos europeos y de Groenlandia; en las que, aunque la diferencia no es tan pronunciada, sí es significativa para todos los analitos estudiados (BDE-28, 33, 47, 99, 100, 153 y 154).

Normalmente, los niveles encontrados en las muestras de peces no suelen ser muy elevados, aunque depende del tipo de espécimen a analizar. Los situados en los niveles altos de la cadena trófica y con mayor contenido lipídico como ballenas, tiburones o focas, suelen presentar niveles superiores a los peces, moluscos o crustáceos debido a su poder de bioacumulación y a la tendencia que ofrecen estos compuestos a quedar retenidos en

II. INTRODUCCIÓN

muestras con alto contenido lipídico. Sin embargo, estos niveles dependen también de la proximidad a zonas industriales o zonas de reciclado. Esto coincide con lo presentado por Wu et al. [505] donde destacan las elevadas concentraciones detectadas en algunos ejemplares de carpas (*Cirrhinus molitorella*) procedentes de zonas próximas a una planta de reciclado de material electrónico del sur de China, en los que, pese a presentar sus concentraciones en peso húmedo, los niveles alcanzan valores de hasta 1.283 ng g⁻¹ para el BDE-47 o de hasta 549 ng g⁻¹ para el BDE-209.

Al igual que en la determinación en moluscos, los estudios de los NFRs orientados a determinar la presencia en muestras de peces no son comparables con aquellos centrados en la determinación de los PBDEs. En este caso, tampoco existe ninguna investigación destinada a la determinación del TTBPP en este tipo de matriz, y continúan siendo escasos los que estudian la presencia del EHTBB y DEHTBP, donde sólo destaca el llevado a cabo por Zhou et al. [504] a partir de peces procedentes de lagos canadienses. Este es quizá uno de los trabajos más completos en cuanto a variedad y cantidad de FRs (de los de interés en la presente memoria) determinados, entre los que se encuentran algunos PBDEs (BDE- 47, 99, 100, 153, 154, 183, 197 y 209) junto con algunos NFRs (EHTBB, DEHTBP, BTBPE, DBDPE y ambos isómeros del DP). Entre todos las concentraciones detectadas, destacan los valores alcanzados por el BDE-47 (hasta 740 ng g⁻¹ ww), junto con la detección de varios de los NFRs estudiados, principalmente del EHTBB y DEHTBP con concentraciones comprendidas entre 0,011 - 0,041 ng g⁻¹ ww y 0,044 - 0,078 ng g⁻¹ ww, respectivamente, mientras que los otros tres no pudieron ser cuantificados.

Otros NFRs como el BTBPE y el DBDPE han sido detectados en un mayor número de ocasiones en muestras de peces [382,460,467,501,503,504,506]. Muschy et al. [503] detectaron ambos compuestos, junto con 38 congéneres de los PBDEs, en lenguados (*Solea solea* L.) procedentes de las costas francesas tras evaluar muestras de hígado y músculo, encontrando las mayores concentraciones en muestras de hígado arrojando niveles de hasta 0,0724 y 0,0211 ng g⁻¹ ww para el BTBPE y el DBDPE, respectivamente.

Por último, se determinaron los isómeros del DP en una gran variedad de muestras de peces [389,425,461,467,486,502,504,506], encontrándose normalmente el isómero *anti* en mayor cantidad. En este caso, destacan los valores encontrados en muestras de hígado, músculo y cerebros de carpas (*Cirrhinus molitoralle*) y peces (*Channa argus*) procedentes de estanque contaminados de China, donde se alcanzan concentraciones de hasta 79,5 y 56,6 ng g⁻¹ ww en hígado de la segunda de las especies para el *anti*-DP y *syn*-DP, respectivamente, y que alcanzan los 50 ng g⁻¹ ww en muestras de cerebros de carpas para el *anti*-DP [389].

Tabla II.14. Concentraciones (ng g⁻¹ ww) de PBDEs en muestras de biota. (nc: no cuantificable, nd: no detectable, est.: estuario)

PAÍS	ANIMAL	MUESTRA	ZONA	BDE-47	BDE-85	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	BDE-183	BDE-209	REF.
	molusco	todo	mar	0,6 - 5,0*	nd - 0,4*	0,06 - 2,1*	nd - 1,4*	nd - 0,3*	nd - 0,4*	nd - 0,1*	nd - 0,9*	[471]
Francia	molusco	todo		0,01 - 0,06	-	nd	nd	nd	nd	-	-	[475]
	peces	músculo e hígado	est.	0,06 - 4,15	-	nc - 1,50	nd - 2,0	nc - 0,96	nc - 0,79	-	-	
Italia	moluscos	todo	mar	nc - 2,52	-	nc - 0,97	nc - 0,65	-	-	-	nc - 1,20	[507]
	Foca	hígado		0,28 - 26	nd - 0,46	0,01 - 14	0,01 - 2,0	nd - 1,8	nd - 3,1	0,03 - 0,08	-	[493]
Noruega	peces	hígado	mar	0,52 - 1,41	-	nd - 0,20	nd - 0,15	nd	nd	nd	-	[334]
	peces	todo		0,12 - 1,22	-	0,07 - 0,34	0,05 - 0,27	nd - 0,15	0,01 - 0,08	-	nd - 0,04	[476]
USA	molusco	todo	mar	nd - 68*	1,2 - 2,8*	1,1 - 38*	nd - 15*	0,2 - 2,8*	0,07 - 1,3*	0,09 - 2,3*	nd*	[336]
Rep. Checa	peces	músculo	río	0,4 - 27,5	nd	nd - 1,9	0,1 - 4,7	nd - 1,8	nd - 3,9	nd - 0,3	-	[479]

* concentración en ng g⁻¹ dw, BDE-197 no estudiado en ninguna de estas investigaciones.

Tabla II.15. Concentraciones (ng g^{-1} ww) de NFRs en muestras de biota. (nc: no cuantificable, nd: no detectable)

PAÍS	ANIMAL	MUESTRA	ZONA	EHTBB	DEHTBP	BTBPE	DBDPE	syn-DP	anti-DP	REF.
España	peces	-	río	-	-	-	-	0,02 - 0,28**	0,05 - 1,33**	[425]
Francia	peces	hígado	mar	-	-	nd - 0,07	nd - 0,02	-	-	[503]
		músculo		-	-	nd-0,001	nd-0,004	-	-	
USA	molusco	todo	mar	-	-	0,2 - 2,0*	-	-	-	[336]
Canadá	peces	-	lago	0,01-0,04	0,04-0,08	nc	nc	nc	nc	[504]
	peces	-	estanque cercano a planta de reciclaje	-	-	1,71 - 518**	nd - 338**	-	-	[460]
		músculo		-	-	-	-	0,05 - 0,56	0,10 - 1,25	
China	peces	hígado	estanque contaminado	-	-	-	-	0,96 - 56,6	2,06 - 79,5	[389]
		músculo		-	-	-	-	-	-	
		cerebro		-	-	-	-	0,73 - 19,4	5,20 - 50,0	

* concentración en ng g^{-1} dw, ** concentración en ng g^{-1} lw, TTBP no se detecta en ningún estudio.

Los diferentes resultados ofrecidos junto con los presentados en las siguientes Tablas (II.14 y II.15) muestran una presencia significativa de estos contaminantes en el medioambiente. Sin embargo, no existen apenas estudios orientados a la detección simultánea de PBDEs y varios NFRs en muestras de moluscos. Por tanto, en la presente Tesis Doctoral se desarrolla un nuevo método que permite la determinación de todos ellos en moluscos obteniendo bajos LODs y simplificando al mismo tiempo la etapa de preparación de muestra.



2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Una de las etapas básicas en el proceso analítico es la etapa de preparación de la muestra, en la que se intenta extraer de la matriz original los compuestos de interés para poder proseguir con su posterior determinación. Las técnicas de preparación de muestra tienen una serie de objetivos principales, entre los que se recogen:

- Aislamiento de los compuestos de interés de la matriz de la muestra, puesto que la mayor parte de los instrumentos analíticos no permiten la introducción de la muestra de forma directa. La preparación de la muestra incluye procedimientos de extracción y al mismo tiempo también podría incluir procedimientos de limpieza de las matrices de mayor complejidad.
- Aumentar la concentración del analito en el nuevo medio frente a la concentración que existía en la muestra original provocando el incremento de la sensibilidad.

Con estos objetivos en mente, se han estado desarrollando a lo largo de los años numerosas técnicas para lograr extraer los compuestos contaminantes de diversas matrices. Actualmente, estos nuevos procedimientos de preparación de muestra tienen también como objetivo la sustitución de las técnicas más clásicas por otras que conlleven un menor consumo de disolventes orgánicos, menor cantidad de muestra a emplear, simplicidad del procedimiento, posibilidad de automatización y si es posible con un bajo coste global.

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado la determinación de parabenes, triclosán, PFASs y FRs en muestras acuosas (ría, río, mar, efluentes e influentes) y muestras sólidas (moluscos). A lo largo de esta sección, se realizará una revisión bibliográfica entre las diferentes metodologías de pretratamiento aplicadas para el aislamiento de los anteriores contaminantes emergentes en muestras de la naturaleza; proporcionando una explicación más detallada de aquellas empleadas en la presente memoria: extracción con ad/absorbentes poliméricos de bajo coste, extracción en fase sólida (SPE), extracción con disolventes asistida con membranas (MASE) y extracción de la matriz en fase sólida (MSPD).

2.1 MATRICES ACUOSAS: AGUAS

2.1.1 Extracción líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction, LLE*)

La LLE es una metodología clásica ampliamente utilizada para la separación de compuestos orgánicos en matrices acuosas. Está basada en la distribución o el reparto de los analitos entre dos fases inmiscibles, generalmente un medio acuoso (la muestra) y un disolvente orgánico. La selectividad y eficacia del proceso dependen principalmente de la elección de este disolvente, que debe presentar una gran afinidad por los analitos, una solubilidad en agua inferior al 10 % y una P_v baja para facilitar la concentración de los extractos. Esta técnica presenta a su vez varios inconvenientes como la dificultad de automatización, formación de emulsiones y el consumo elevado de disolventes orgánicos que acarrea un incremento del tiempo de extracción y un aumento de los costes y perjuicios medioambientales del análisis [508].

Entre los PCPs estudiados (parabenes y triclosán), esta técnica ha sido aplicada en contadas ocasiones [36,123,147,175,176,182,509,510] frente a otro tipo de técnicas, destacando entre ellas el estudio realizado por Nishi et al. [511] donde se optimizó un procedimiento de LLE empleando la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrofotometría ultravioleta-visible (LC-UV-VIS) para la determinación de triclosán en muestras de aguas superficiales. Para ello, se extrajeron 500 mL de muestra acidificada previamente a pH 2 - 3 con dos porciones de 50 mL de hexano, proporcionando recuperaciones del 95 % y un LOQ de 3 ng L^{-1} . También Bester et al. [71] aplicaron esta metodología para extraer triclosán de 1 L muestras de agua residual sin filtrar empleando para ello 10 mL de tolueno, eliminando las trazas de agua mediante un proceso de congelación (-20°C). El análisis se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) obteniendo recuperaciones del 88 % y LOQs de 3 ng L^{-1} .

Por otro lado, la aplicación de este tipo de metodología en la extracción de los PFASs a partir de muestras de aguas ha sido notablemente inferior, destacando únicamente un par de investigaciones. Clara et al. [512] emplearon esta técnica para extraer PFCAs (C6 - C12) y diferentes PFSAs, incluyendo en PFOS, a partir de muestras de río (700 - 800 mL) ajustadas a un pH de 4 y realizando las extracciones con tres porciones de metil *tert*-butil éter (MTBE). Las recuperaciones de los analitos de interés para la presente memoria se encontraron comprendidas entre el 92 y 107 %. González-Barreiro et al. [513] realizaron un estudio comparativo donde optimizaron dos procesos de preparación de muestra (LLE frente a SPE) para la extracción, al igual que en el caso anterior, de PFCAs (C6 - C12) y diferentes PFSAs (incluyendo PFOS) a partir de muestras de aguas. El procedimiento optimizado de LLE se realiza con volúmenes de muestra comprendidos entre 400 y 900 mL

a pH de 4, con adición de cloruro sódico y realizando las extracciones con tres porciones de MTBE. Las satisfactorias recuperaciones obtenidas (80 - 93 %) y los bajos LODs del método (para 900 mL, 0,26 - 0,62 ng L⁻¹, excepto PFHxA (4,4 ng L⁻¹)), junto con la posibilidad de poder realizar las extracciones sin la necesidad de una etapa previa de filtración de muestra hacen de la LLE una técnica adecuada para la extracción de estos analitos en aguas, principalmente para los PFSA de cadena larga, donde la SPE no proporciona tan buenos resultados.

En el caso de los FRs, esta técnica ha sido empleada en contadas ocasiones [427,445,452,462,463]. Entre los estudios más actuales destaca el llevado a cabo por Novak et al. [452] en donde desarrollaron un método para la extracción de algunos PBDEs (28, 47, 99, 100, 153 y 154) a partir de muestras de agua procedentes de ríos y mares, empleando para ello volúmenes de muestra de 300 mL acidificados a pH 2, junto con 300 mL de una disolución tampón (pH 6) de tris-citrato y 2 mL de isooctano como disolvente de extracción. Finalmente, tras optimizar diferentes parámetros que afectan tanto a la etapa de extracción como a la separación y detección, se obtienen recuperaciones comprendidas entre un 97 y un 103 % en aguas dulces para todos los analitos, con LODs inferiores a 0,0064 ng L⁻¹ y 0,0054 ng L⁻¹ para agua dulce y salada, respectivamente. En cuanto a los NFRs, esta técnica se empleó únicamente para la extracción de los isómeros del DP [445,462,463], utilizando en todas ellas tres fracciones de 100 mL de diclorometano como disolvente de extracción de acuerdo con el procedimiento establecido por el Laboratorio Nacional de Muestras Ambientales de *Environment Canada*; presentando en el caso de Qi et al. [462] recuperaciones de ambos isómeros en muestras de río comprendidas entre un 71 y un 94 % con LODs de 0,05 y 0,04 ng L⁻¹ para *syn*-DP y *anti*-DP, respectivamente.

2.1.2 Extracción en fase sólida (Solid-phase extraction, SPE)

La SPE se desarrolló a mediados de los años 70 como una alternativa a la LLE, viéndose incrementadas sus aplicaciones durante los 80 y 90. Hoy en día, se trata de una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizada en el caso de matrices líquidas o incluso gaseosas. Este procedimiento está basado en la retención selectiva de los analitos en un soporte sólido y en su posterior elución con un disolvente adecuado; logrando de este modo su concentración, purificación e incluso la posibilidad de separar los distintos analitos entre sí mediante una elución fraccionada con distintos disolventes [514].

Etapas de la SPE

A continuación, en la Figura II.3 se recogen de forma esquematizada las etapas típicas de un procedimiento de SPE [508]:

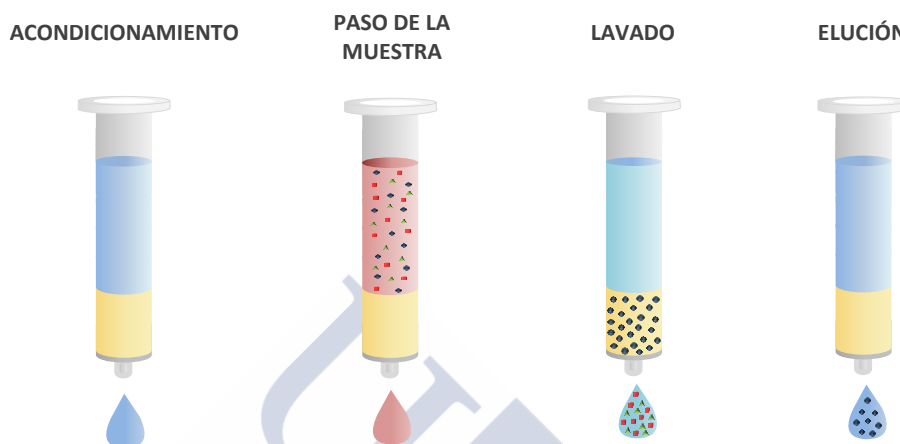


Figura II.3. Etapas típicas de un procedimiento SPE.

- **Acondicionamiento de la fase estacionaria.** Etapa cuyo objetivo es la solvatación de los grupos funcionales presentes en la fase estacionaria contenida en el cartucho tras el paso de uno o varios disolventes, mejorando de este modo la interacción con los componentes de la matriz. Entre los disolventes más empleados se encuentran el metanol (interacciona tanto con grupos silanoles polares como con los grupos funcionales ligados apolares), el acetonitrilo, la acetona, el isopropanol y el tetrahidrofurano (THF). Este punto es particularmente importante cuando se trabaja con fases enlazadas sobre partículas de sílice, particularmente con fases apolares; sin embargo, aunque no es necesario realizar un acondicionamiento como tal con otras fases estacionarias, es habitual pasar un pequeño volumen de disolvente para eliminar las posibles impurezas.
- **Paso de la muestra.** A continuación, se hace pasar la muestra a través del cartucho donde quedarán retenidos tanto los analitos como algunas sustancias interferentes. La muestra puede ser introducida por gravedad o, más frecuentemente, mediante aplicación de presión positiva o negativa para acelerar el proceso, manteniendo en todo momento una velocidad de flujo controlada que permita la completa retención de los analitos mediante fuerzas intermoleculares con el adsorbente. En esta etapa es necesario evitar el secado del adsorbente cuando se trabaja con fases en base de

sílice, puesto que la presencia de aire en la columna evita el contacto eficiente entre las fases líquidas y sólidas.

- **Lavado.** En ocasiones, se hace pasar un disolvente selectivo que permite eluir algunas de las interferencias retenidas previamente, manteniendo retenidos los analitos de interés en el lecho del adsorbente.
- **Secado.** Etapa necesaria en algunos casos para eliminar los restos de agua, empleada normalmente tras la etapa de lavado, evitando así problemas de miscibilidad con los disolventes empleados en la última etapa.
- **Elución de los analitos.** Finalmente, los analitos son extraídos del adsorbente mediante la adición de un disolvente que interacciona más fuertemente con ellos que las partículas de la fase sólida. Los disolventes empleados en esta etapa deben ser capaces de romper todas las interacciones de los analitos con los grupos funcionales del adsorbente para obtener así resultados reproducibles y buenas recuperaciones.

Adsorbentes

La selección del adsorbente más adecuado depende de varios factores, principalmente del tipo de analito y de los grupos funcionales presentes en su estructura; sin embargo, esta elección puede estar también condicionada por la naturaleza de la matriz y las interacciones que esta pueda realizar tanto con los analitos como con el propio adsorbente. Es necesario seleccionar también una cantidad de fase sólida que garantice la existencia de suficientes sitios activos para retener a todos los analitos presentes en la matriz evitando así la pérdida de los mismos durante la etapa de carga de la muestra. Este punto adquiere mayor importancia en muestras con alto contenido en materia orgánica, ya que la capacidad del cartucho puede ser menor de la esperada al bloquearse una gran parte de los sitios activos por la unión con moléculas interferentes presentes en la matriz. Otro factor a tener en cuenta será el volumen de muestra a emplear, puesto que si existen interacciones débiles entre los analitos y los puntos activos, volúmenes elevados pueden causar la elución de los compuestos de interés durante la etapa de carga. El volumen a partir del cual se produce este fenómeno se le conoce como volumen de rotura [514-516].

En los inicios, los adsorbentes más empleados fueron los óxidos inorgánicos, las sílices enlazadas y el carbón grafitizado, sin embargo, con el paso de los años han comenzado a ser sustituidos por adsorbentes poliméricos que proporcionan diversas

ventajas frente a los más clásicos, entre ellas una mayor estabilidad frente a pH extremos, ausencia de grupos silanoles residuales y un elevado volumen de rotura permitiendo detectar compuestos a niveles inferiores, alcanzado el orden de los ng L^{-1} . A continuación, se describen detalladamente algunos de los más importantes.

- **Óxidos inorgánicos (interacción de fase normal).** Los más empleados son la sílice, la alúmina, el Florisil (silicato de magnesio sintético) y la tierra de diatomeas. Actúan reteniendo fuertemente a los compuestos con grupos funcionales susceptibles de establecer puentes de hidrógeno (ácidos, alcoholes, aminas...), en menor extensión a las moléculas con carácter dipolar significativo (ésteres y cetonas) y débilmente a las que presentan grupos funcionales polarizables (anillos aromáticos, alquenos). Ejemplos de este tipo de interacción son: moléculas con grupos polares son extraídas desde matrices predominantemente no polares hacia adsorbentes con propiedades de superficie polares mediante interacciones polares, ya sea por medio de enlaces por puente de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo. La elución de los analitos se realiza con disolventes con carácter polar, tras competir con el adsorbente por el analito; mientras que los disolventes no polares favorecen la retención de los compuestos. Los grupos funcionales que presentan este tipo de interacciones son los hidroxilos, aminas, carbonilos, anillos aromáticos, sulfhidrilos, dobles enlaces y grupos con heteroátomos.
- **Sílice enlazada.** Se obtienen por reacción de organosilanos con sílice activada mediante la formación de enlaces silil-éter. Se establece una clasificación en función de las interacciones existentes entre adsorbente y analito [508,514]:
 - *Fase reversa:* las moléculas con grupos funcionales no polares se extraen desde matrices predominantemente polares hacia adsorbentes con propiedades de superficie no polares, favorecidas por las fuerzas de Van der Waals. La elución de los analitos se logra con el paso de disolventes con carácter no polar, mientras que los polares favorecen la retención de los compuestos. El C_{18} enlazado a la sílice es el adsorbente más empleado, sin embargo presenta problemas debido a su baja selectividad.
 - *Intercambiadores iónicos:* retenciones mediante interacciones electroestáticas entre una molécula del analito con carga y los grupos cambiadores del adsorbente con carga opuesta. Los grupos que pueden dar lugar a este tipo de interacciones son los catiónicos (aminas primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria y cationes inorgánicos) y los grupos aniónicos (ácidos carboxílicos y sulfónicos, fosfatos y otros grupos similares). Los grupos susceptibles de ser iónicos pueden estar cargados o no, dependiendo del pH del medio en que se encuentren. Los analitos se eluyen ya sea con un disolvente orgánico tras haber sido neutralizados a su forma molecular, o por

II. INTRODUCCIÓN

desplazamiento al emplear un disolvente con una concentración relativamente elevada de un ion desplazante.

Tabla II.16. Adsorbentes de sílice enlazada más comunes en SPE [508].

ADSORBENTE	FASE	ESTRUCTURA
Sílice (SiO ₂)	Normal	-Si-OH
Cianopropilsilano (CN)	Normal	-Si-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CN
Diolsilano (2OH)	Normal	-Si-(CH ₂) ₄ -CHOH-CH ₂ OH
Aminopropilsilano (NH ₂)	Normal	-Si-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
N-propiletilen-diaminosilano (PSA)	Normal	-Si-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂
Octadecilsilano (C ₁₈)	Reversa	-Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
Octilsilano (C ₈)	Reversa	-Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃
Etilsilano (C ₂)	Reversa	-Si-CH ₂ -CH ₃
Fenilsilano (Ph)	Reversa	-Si-Ph
Ciclohexilsilano (CH)	Reversa	-Si-C ₆ H ₁₁
Bencenosulfonil-propilsilano (SCX)	Intercambiador catiónico	-Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻ -Ph
Sulfonilpropilsilano (PRS)	Intercambiador catiónico	-Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻
Carboximetilsilano (CBA)	Intercambiador catiónico	-Si-CH ₂ -COO ⁻
Dietilaminopropilsilano (DBA)	Intercambiador aniónico	-Si-(CH ₂) ₃ -NH ⁺ -(CH ₂ -CH ₂) ₂
Trimetilamino-propilsilano (SAX)	Intercambiador aniónico	-Si-(CH ₂) ₃ -N ⁺ -(CH ₃) ₃

Las sílices enlazadas son los adsorbentes más comúnmente utilizadas en SPE, sin embargo son inadecuadas para algunas aplicaciones. Conllevan muy frecuentemente a la disminución del volumen de rotura de moléculas pequeñas y altamente polares dificultando la cuantificación a niveles traza. Pueden contener grupos silanoles ionizados capaz de retener a algunos analitos de forma irreversible y presentan además inestabilidad a pH extremos (2 > pH > 8) [515]. La Tabla II.16 recoge algunos de los adsorbentes más empleados de sílice enlazada junto con sus estructuras.

- **Adsorbentes poliméricos.** Constituidos por estructuras poliméricas que, por lo general, retienen a los analitos a través de fuerzas de Van der Waals y mediante enlaces π - π con los anillos presentes en la estructura polimérica. Uno de los primeros disponibles fue el formado por copolímeros macroporosos de estireno-divinilbenceno (PS-DVB) caracterizado por un área superficial específica de hasta 800 m² g⁻¹. Estos adsorbentes superan muchas de las limitaciones de las sílices enlazadas, presentan estabilidad en un mayor rango de pH (1 - 14) y mejoran la retención de los compuestos polares debido al elevado número de anillos aromáticos activos en su estructura; sin embargo, presentan

una capacidad y selectividad en la extracción de los compuestos orgánicos limitada. Entre ellos destacan las resinas de amberlita (Amberlite XAD-2 o XAD-4), aunque actualmente poco empleadas por varios problemas asociados con la pérdida de selectividad, bajos volúmenes de rotura para compuestos muy polares, bajo flujo de muestreo e incluso por la necesidad de realizar largas etapas de limpieza previas al paso de la muestra [508].

Con el paso de los años continúa la búsqueda de nuevos materiales con mayor área superficial específica, es decir, mayor número de puntos de interacción entre adsorbente y analito, y en consecuencia mayor capacidad de retención. Con este fin, surgen alrededor de 1970 los polímeros altamente hipercruzados (*hypercrosslinked*) cuya síntesis sigue las polimerizaciones usuales para la obtención de adsorbentes poliméricos macroporosos con la diferencia de la adición de un elevado contenido de agente entrecruzante (DVB) originando una estructura de gran porosidad con un área de superficie específica muy superior ($1.000 - 2.000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Sin embargo, la principal desventaja es el bajo poder de retención de los compuestos más polares como consecuencia del carácter hidrofóbico que presentan los polímeros *hypercrosslinked* [516].

Una solución para modificar el carácter apolar de los polímeros *hypercrosslinked* (aplicable también a los polímeros macroporosos) consiste en combinar un monómero hidrofílico (contribuye a la polaridad de la resina) con otro entrecruzante (normalmente DVB, contribuye a aumentar el área superficial específica) facilitando así la retención de los analitos más polares. El adsorbente Oasis HLB® (*Hydrophilic lipophilic balance*, estructura recogida en Figura II.4), es uno de los más ampliamente utilizados, constituido por un copolímero macroporoso basado en poli(*N*-vinilpirrolidona-divinilbenceno) (PVP-DVB) con un área superficial específica de $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Su éxito se debe a su capacidad para extraer compuestos con un amplio rango de polaridad y a la posibilidad de eliminar la etapa de acondicionamiento.

Una segunda opción para modificar el carácter apolar de los polímeros *hypercrosslinked* consiste en modificar químicamente la estructura con grupos funcionales polares (acetilo, hidroximetilo, sulfónico, benzoilo), reduciendo de este modo la tensión interfacial entre la superficie polimérica y la fase acuosa, lo que facilita el contacto entre muestra y adsorbente. La Tabla II.17 recoge algunos de los adsorbentes poliméricos más empleados detallando información de alguna de las características más relevantes.

II. INTRODUCCIÓN

Tabla II.17. Adsorbentes poliméricos más comunes empleados en SPE [516].

PROPIEDADES	ADSORBENTE	MATERIAL	COMPAÑÍA	ÁREA SUPERF. (m ² g ⁻¹)
Macroporoso	Amberlite XAD-1	PS-DVB	Rohm & Haas	100
	Amberlite XAD-2	PS-DVB	Rohm & Haas	300
	Amberlite XAD-4	PS-DVB	Rohm & Haas	≥ 750
	PLRP-S-10	PS-DVB	Polymer Laboratories	500
	PLRP-S-30	PS-DVB	Polymer Laboratories	375
<i>Hyperscrosslinked</i>	Envi-Chrom P	PS-DVB	Supelco	800 - 950
	Bakerbond SDB-1	PS-DVB	J.T. Baker	1.060
	LiChrolut EN	PS-DVB	Merck	1.200
	Styosorb 2m	PS-DVB	Purolite International	910
	Styosorb MT-43	PS-DVB	Purolite International	1.050
	Styosorb MN-150	PS-DVB	Purolite International	1.070
	Chromabond HR-P	PS-DVB	Macherey-Nagel	1.200
	HySphere	PS-DVB	Spark Holland	> 1.000
	Amberchrom GC-161m	PS-DVB	TosoHaas	900
Monómero	Amberlite XAD-7	MA-DVB	Rohm & Haas	450
hidrofílico	Amberlite XAD-8	MA-DVB	Rohm & Haas	310
	Oasis HLB	PVP-DVB	Waters	830
	Porapak RDX	PVP-DVB	Waters	nd
	Absolut Nexus	MA-DVB	Varian	575
	Discovery DPA-6S	Poliamida	Supelco	nd
Modificados químicamente	Bond Elut PPL	PS-DVB	Varian	700
	Isolute ENV+	PS-DVB-OH	IST	1.000 - 1.100
	Strata X	PS-DVB	Phenomenex	800
	Chromabond EASY	PS-DVB	Macherey-Nagel	650 - 700
	Spe-ed Advanta	PS-DVB	Applied Separations	nd

La aparición de todos estos nuevos materiales supuso un gran avance en el campo de la SPE. No obstante, todavía se continúa investigando para lograr un aumento tanto de la capacidad como de la selectividad de estos adsorbentes. De este modo surge la aparición de los denominados polímeros de modo mixto, como resultado de la introducción de grupos iónicos en el adsorbente polimérico, logrando así que la retención de los compuestos pueda realizarse mediante dos mecanismos diferentes en función de las características estructurales del analito: fase reversa e intercambio iónico. Esto implica que con un control del pH tanto en la etapa de limpieza como en la de elución se puede realizar una eliminación controlada tanto de las interferencias como de los analitos. Waters fue la primera compañía en comercializar los primeros polímeros de modo mixto partiendo de la estructura de Oasis® HLB. En un primer momento salen al mercado los adsorbentes Oasis® MAX (*mixed-mode anionic exchange*) y Oasis® MCX

(*mixed-mode cationic exchange*), intercambiadores aniónico y catiónico fuertes obtenidos tras la inserción de una amina cuaternaria y un grupo sulfónico, respectivamente. Posteriormente, se desarrollaron los correspondientes intercambiadores aniónico (Oasis® WAX, grupo piperacina) y catiónico (Oasis® WCX, grupos carboxílicos) débiles. En la Figura II.4 se recogen las estructuras del adsorbente Oasis® HLB juntos con los polímeros de modo mixto fabricados a partir del mismo.

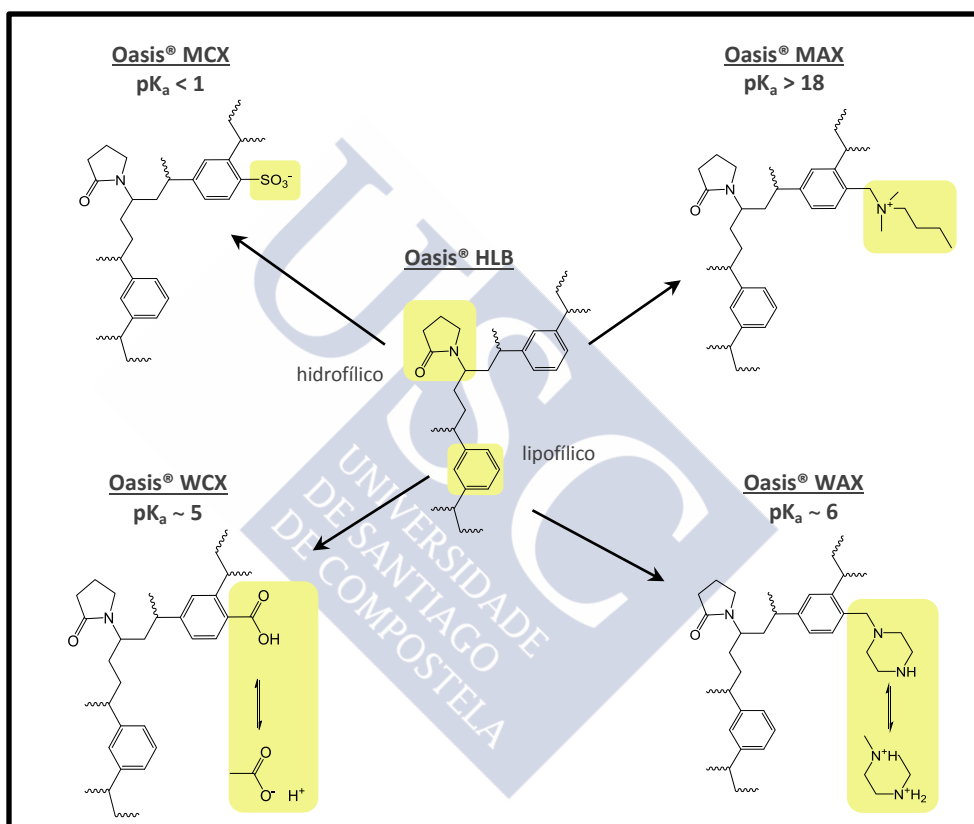


Figura II.4. Estructuras del adsorbente polimérico Oasis® HLB y de los polímeros de modo mixto derivados [517].

En la presente Tesis Doctoral se han evaluado dos de los adsorbentes poliméricos anteriores, Oasis® HLB y Oasis® WAX, para el análisis de PFASs en muestras de agua de mar. Hasta la fecha, las extracciones de estos analitos en las matrices acuosas se suelen realizar con ambos tipos de materiales, sin embargo el desarrollo de la metodología empleada se realiza en todo momento con muestras de agua dulce, aplicándose posteriormente a la determinación de estos compuestos en aguas saladas. A diferencia de las aguas dulces, el

elevado número de iones presentes en agua salada pueden competir con los analitos por los sitios de intercambio iónico presentes en el adsorbente, modificando así el mecanismo de retención y por tanto afectando a la eficacia de extracción.

Además de los citados anteriormente, existen una gran variedad de adsorbentes como por ejemplo: el carbón grafitizado, adsorbentes de acceso restringido (RAM), adsorbentes de afinidad o inmunoadsorbentes, polímeros impresos molecularmente (MIPs), materiales monolíticos o fases continuas y nanotubos de carbono.

Ventajas e inconvenientes

Teniendo en cuenta que la SPE surge como alternativa a LLE, es necesario conocer las ventajas que esta técnica aporta durante el procedimiento de preparación de la muestra. La SPE supera en gran medida muchas de las limitaciones propias de la LLE: reduce el consumo de disolvente orgánico, implica una baja manipulación de la muestra, evita la formación de emulsiones, permite llevar a cabo la extracción y concentración de los analitos en una única etapa, es aplicable a un gran número de analitos y matrices diferentes debido a la gran variedad de adsorbentes disponibles, alcanza valores de preconcentración y porcentajes de recuperación elevados, fácilmente automatizable, ofrece la posibilidad de purificación de extractos simultáneamente a la extracción y compatibilidad con la detección cromatográfica.

No obstante, esta técnica presenta algunas desventajas en sí misma: el precio de los cartuchos eleva el coste global del proceso; y pese a que el consumo de disolventes orgánicos y cantidad de muestra necesaria es menor frente a la LLE, estos niveles todavía son elevados frente a los empleados en las actuales técnicas de microextracción.

Aplicación de SPE en matrices medioambientales

A continuación, se recogen las aplicaciones más relevantes para la extracción de los analitos estudiados en la presente memoria empleando SPE como técnica de extracción.

A. Parabenes y triclosán

La SPE ha sido hasta la fecha la técnica de preparación de muestra más empleada para la determinación de parabenes y triclosán en muestras acuosas. Teniendo en cuenta la

amplia distribución de estos analitos en los diferentes compartimentos ambientales, esta técnica se ha empleado desde matrices acuosas sencillas (agua potable) hasta muestras con elevado contenido en material orgánico (aguas residuales), en la que suele ser necesaria una etapa de filtración previa de la muestra para evitar la obstrucción de la fase sólida. Los adsorbentes poliméricos han sido los más utilizados, especialmente los Oasis® HLB en sus múltiples tamaños (60, 200 y 500 mg) tanto para extracciones de pocos analitos [37,133] como en métodos multicomponente [130,152,157,518]. No obstante, pese a ser los adsorbentes más ampliamente empleados y con resultados muy satisfactorios, algunos estudios muestran la influencia de algunos parámetros como el pH en la extracción de estos analitos. González-Mariño et al. [133] demostraron la ineffectividad de estos adsorbentes (Oasis HLB 60 mg) para la extracción de los parabenes más polares (MeP y EtP) a pHs de muestra muy básicos próximos a 12, donde se reducen considerablemente los niveles de las recuperaciones. Este comportamiento se debe a la transformación de ambos compuestos a su forma aniónica e hidrofílica originando un empeoramiento de la retención. Sin embargo, tanto en este caso como en otras investigaciones [131,134] se han obtenido resultados gratamente satisfactorios para todos los analitos al emplear diferentes tipos de muestras acuosas (río, grifo y residuales) a niveles de pH neutros o ácidos con valores comprendidos entre un 73 y un 109 %. Por otro lado, la presencia de elevados contenidos de material orgánico particulado característico de las aguas residuales limita en gran medida el volumen de muestra, ya que puede provocar en la mayor parte de los casos la obstrucción del cartucho. Uno de los parámetros más interesantes a tener en cuenta en la SPE es el volumen de rotura, puesto que determina el factor de concentración y ayuda a disminuir los LODs del método. Blanco et al. [131] comprobaron la posibilidad de trabajar con volúmenes de muestra de hasta 2 L sin generarse pérdidas de ninguno de los analitos, ni siquiera de aquellos más polares. Entre los disolventes más empleados en la etapa de elución se encuentran el metanol, el diclorometano y el acetato de etilo.

Se han empleado también otro tipo de adsorbentes poliméricos además del Oasis® HLB, como copolímeros de PS-DVB (SDB-XC [193] y Bio Beads SM-2 [72]), los polímeros químicamente modificados Isolute ENV+ [169], Strata X [142,519] y Bond Elut Plexa [134], y los adsorbentes en modo mixto Oasis® MCX [137,143,159,520,521] y Oasis® MAX [49,172]. Pedrouzo et al. [134] realizaron un estudio comparativo para evaluar la efectividad de los cartuchos Bond Elut Plexa frente al Oasis® HLB en la extracción de MeP, EtP, PrP, BzP, triclosán, triclocarbán y cinco filtros UV en muestras de agua ajustadas a pH 3. Encontraron diferencias con el paso de la muestra de agua de río (500 mL) donde aquellos analitos más polares, como MeP y EtP, presentaban recuperaciones inferiores al emplear Oasis® HLB (25 y 22 %, respectivamente) frente a las obtenidas con el Bond Elut Plexa (88 % para ambos analitos). Sin embargo, empleando inferiores volúmenes de muestra de aguas residuales

(100 mL para influente y a 250 mL para efluente) no se aprecian diferencias en las recuperaciones obtenidas entre ambos adsorbentes. No obstante, tras un estudio comparativo entre Oasis® HLB (60 mg) y Oasis® MCX (150 mg), Gracia-Lor et al. [152] seleccionaron finalmente los Oasis® HLB para la extracción de MeP, EtP, PrP y BuP a partir de aguas residuales sin ajuste de pH, tras obtener recuperaciones superiores con el primero de ellos principalmente para los analitos más polares.

Entre los adsorbentes no poliméricos, el octadecilsilano (sílice enlazada a C₁₈) ha sido el más empleado para los agentes antimicrobianos como el triclosán, eluidos normalmente con disolventes como acetona [126], acetato de etilo [192,522], metanol [169,180] o hexano [167] entre otros. Agüera et al. [169] desarrollaron un estudio comparativo entre tres tipos de adsorbentes: Sep-Pak C₁₈ (500 mg), Oasis® HLB (200 mg) e Isolute ENV+ (200 mg), para lograr la extracción de bisfenol A y triclosán a partir de muestras de aguas residuales. Después de realizar etapas de acondicionamiento específicas para cada material, se atraviesa el cartucho con 50 mL de la muestra filtrada ajustada a pH 4, realizando las eluciones inicialmente con metanol seguido de acetona. Los resultados muestran recuperaciones notablemente diferentes entre los tres adsorbentes, siendo el C₁₈ el que proporciona mejores resultados (84 %) frente los obtenidos con Oasis® HLB y Isolute ENV+ (68 y 69 %, respectivamente).

Además de los anteriores adsorbentes, Beltran et al. [523] desarrollaron recientemente dos MIPs para la extracción de algunos parabenes (MeP, EtP, PrP y BuP) de muestras de agua de río (500 mL), a partir de diferentes procedimientos de síntesis y empleando para el primero de ellos el MeP como molécula plantilla y para el segundo el BuP, demostrando ambos MIPs una mayor afinidad por estos analitos frente a un polímero no impreso molecularmente. Finalmente, se realiza un procedimiento comparativo de SPE empleando por un lado el MIP (plantilla BuP) frente a un adsorbente del tipo Oasis® HLB, obteniéndose para el primero de los casos cromatogramas más limpios y mejores recuperaciones para el BuP.

B. Ácidos perfluoroalquilados

Hasta la fecha, la SPE es también la técnica de extracción empleada con mayor frecuencia para lograr la extracción de los PFASs de diferentes matrices acuosas. En la Tabla II.18 se recogen a modo resumen algunos de los procedimientos de SPE desarrollados para la extracción de estos analitos, detallando los adsorbentes, disolventes empleados en cada una de las etapas y las recuperaciones obtenidas en cada caso. Entre todos los adsorbentes

disponibles en el mercado, han sido los Oasis® WAX de 150 mg y los Oasis® HLB de diferentes capacidades (60, 200, 225 y 500 mg) los que han proporcionado mejores resultados y los más utilizados. Un estudio realizado para la detección de PFASs y fluorotelómeros en muestras de agua de mar, comparó la eficacia de los cartuchos Oasis® HLB (200 mg) y Oasis® WAX (150 mg). En base a los diferentes mecanismos de retención de cada material adsorbente, fue necesario realizar métodos de acondicionamiento diferentes para lograr la solvatación del adsorbente, facilitando así su posterior contacto con los componentes de la muestra. De este modo, el acondicionamiento del Oasis® HLB se realiza con una primera etapa en la que se hace pasar metanol seguido de agua Milli-Q; sin embargo, para Oasis® WAX fue necesaria la introducción previa de un disolvente con un pequeño porcentaje de NH_4OH (0,1 % aprox.) para activar el cambiador aniónico y poder retener los analitos de modo selectivo. A continuación, se pasa una cantidad de muestra determinada sin ajuste de pH (ensayos realizados con agua Milli-Q y aplicado finalmente a agua de mar) a través del cartucho, quedándose retenidos por atracción intermolecular los analitos de interés y algunos compuestos interferentes. La etapa de lavado de los cartuchos Oasis® WAX se realiza con un tampón de acetato (25 mM, pH 4) para eliminar las interferencias producidas por biomoléculas, como lípidos o proteínas, mejorando de este modo la adsorción de los analitos aniónicos en la fase sólida. Tras realizar una etapa de secado eluyen los analitos con metanol y en el caso de los Oasis® WAX seguidos de metanol (0,1 % NH_4OH). Para ambos casos los porcentajes de recuperación han sido próximos al 100 %; sin embargo, los valores obtenidos para el PFHxA (analito de mayor polaridad) a partir del Oasis® HLB disminuyen hasta niveles próximos al 30 %, únicamente con los Oasis® WAX se logran recuperaciones próximas al 100 % para ese analito [524].

En contraposición con el anterior estudio, se presentan los resultados obtenidos por Nakayama et al. [525] tras emplear cartuchos Oasis® HLB Plus (225 mg) para la extracción de los mismos analitos a partir de muestras de agua de río (sin ajuste de pH) con los mismos disolventes de acondicionamiento que en el trabajo anterior, y con la única diferencia en el uso de 100 % de agua Milli-Q en la etapa de lavado y una elución con volúmenes cinco veces inferiores, obtienen recuperaciones notablemente inferiores a las anteriores para los analitos de cadena larga (hasta un 55,3 %) mientras que para los analitos más polares se alcanzan niveles de hasta 96,5 %. Otro estudio con una opinión diferente en cuanto a la efectividad de ambos adsorbentes es el realizado por Wille et al. [288] empleando muestras de agua ajustadas a pH 3 (Oasis® WAX) y sin ajustar (Oasis® HLB), obteniendo buenos recuperaciones para todos los analitos con ambos cartuchos aunque ligeramente superiores con los Oasis® HLB.

II. INTRODUCCIÓN

Hasta el momento del inicio de las investigaciones recogidas en la presente memoria, los estudios llevados a cabo con matrices acuosas han realizado tanto el procedimiento de optimización como la validación de la metodología con muestras de agua dulce, normalmente con agua Milli-Q, aplicándolos posteriormente a la extracción de muestras de agua salada [283,524,526], sin tener en cuenta el efecto que puede generar la salinidad de la matriz sobre los procedimientos de retención de los analitos. Este punto se abordará en uno de los estudios recogidos en la presente memoria. Sin embargo, no sólo el contenido de sal podría afectar, también es necesario tener en cuenta la materia particulada presente en la muestra. De Voogt et al. [205] recomiendan suprimir la etapa de filtración de las muestras acuosas debido a las propiedades tensoactivas de estos compuestos; y, en caso de ser necesario realizarla, emplear filtros de polipropileno puesto que presentan una menor adsorción frente a otros materiales. Otros autores seleccionan el tipo de cartucho en función del contenido de materia particulada para evitar la obstrucción del cartucho. Es el caso de Boone et al. [527], donde emplean cartuchos Oasis® WAX de 150 mg (30 µm tamaño de partícula) para las aguas superficiales, mientras que para las aguas potables tratadas emplea cartuchos de 225 mg (60 µm tamaño de partícula). Las recuperaciones obtenidas tanto para los PFCAs (C6 - C10) como para el PFOS se encuentran comprendidas para ambos procedimientos entre 95 y 108 %.

No obstante, estos dos adsorbentes no han sido los únicos materiales poliméricos empleados para la extracción de los PFASs, también se han utilizado aunque en menor medida otros como los Chromabond HR-P [315], Strata X [216,285,286] o una resina XAD [528] para muestras de mar, río y aguas procedentes de lagos. En el primero de los casos la extracción se realiza *in situ*, acondicionando previamente la resina con 200 mL de metanol seguidos de 50 mL de agua Milli-Q, se bombearon 9 L de agua de mar y se lavaron con 50 mL de agua Milli-Q; la elución se realizó en sentido inverso con 50 mL metanol (5 mM de acetato amónico (NH_4OAc) y 2,5 mM de ácido acético (AcOH)). Se obtienen recuperaciones satisfactorias para todos los analitos (C4 - C12 y PFOS) alcanzando niveles de hasta 109 % excepto para el PFHxA donde estos valores no logran superar el 67 % [315]. Labadie et al. [286] realizan la etapa de acondicionamiento del adsorbente Strata X con metanol (0,2 % NH_4OH), seguida de metanol y agua Milli-Q, tras pasar la muestra de agua de río realiza una etapa de lavado con un tampón de acetato amónico (pH 4,5 y 25 mM), seguida de la elución con metanol (0,2 % NH_4OH); logrando recuperaciones de nuestros analitos (C6 - C12 y PFOS) comprendidas entre 72,3 y 114,6 %. En el tercer caso, se evalúan resinas XAD (XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-1108) limpiadas previamente mediante un tratamiento en el sistema Soxhlet, situándolas a continuación en cilindros de polipropileno con discos de espuma de poliuretano en la zona inferior del cartucho. Se bombean *in situ* a través de este dispositivo 50 L de agua de lago realizando un posterior lavado con metanol en el laboratorio. La

Tabla II.18. Estudios de determinación de PFASs en aguas mediante SPE.

ANALITOS	MUESTRA	PRETRAT.	ACOND.	CARTUCHO	LAVADO	ELUCIÓN	DETECCIÓN	R (%)	REF.
PFCAs (C4-C18) PFASs (incluido PFOS)	120 mL (grifo)		4 mL MeOH (1 % NH ₄ OH) 4 mL MeOH 4 mL agua	Oasis® WAX (150 mg)	4 mL tampón NH ₄ OAc (25 mM, pH 4) 4 mL MeOH	4 mL MTBE:MeOH (9:1, 1 % NH ₄ OH)	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	99-110	[527]
		pH 4							
PFCAs (C4-C18) PFASs (incluido PFOS)	120 mL (río, subterránea)		5 mL MeOH (1 % NH ₄ OH) 10 mL MeOH 10 mL agua	Oasis® WAX (225 mg)	10 mL tampón NH ₄ OAc (25 mM, pH 4) 10 mL MeOH	8 mL MTBE:MeOH (9:1, 1 % NH ₄ OH)	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	95-108	[524]
PFCAs (C4-C18) PFASs (incluido PFOS) (+FTOHs)	100 mL (mar)	-	4 mL MeOH (0,1 % NH ₄ OH) 4 mL MeOH 4 mL Milli-Q	Oasis® WAX (150 mg)	4 mL tampón de acetato (25 mM, pH4) 4 mL MeOH	4 mL MeOH (0,1 % NH ₄ OH)	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	63-102 (Milli-Q)	[307]
PFCAs (C5-C12)	250 mL (río)	sin ajuste pH (~4,1) TBA (125 g L ⁻¹)	6 mL MeOH 10 mL Milli-Q	Supel-Select HLB (200 mg)	-	4 mL MeOH	GC-(NCI)-MS(Q)	53-111	[529]
PFCAs (C6-C10) PFOS	1 L (río y efl.)	filtración (filtro fibra de vidrio 0,47 µm)	10 mL MeOH 10 mL Milli-Q	Oasis® HLB (500 mg)	-	7 mL MeOH	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	77-124 (río) 86-116 (efl.)	[290]
PFCAs (C4-C12) PFASs (incluido PFOS)	500 mL (estuario)	-	5 mL MeOH 5 mL Milli-Q	Oasis® HLB (200 mg)	5 mL Milli-Q (40 % MeOH)	10 mL MeOH	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	77-133	[528]
PFCAs (C4-C10)	50 L (lago)		MeOH y ACN (Sohxlet)	XAD-7 (100 mL)	MeOH	columna cromatográfica	GC-MS (Q)	77-120	

Pretrat.: pretratamiento, acond.: acondicionamiento, TBA: tetrabutil amonio, R: recuperación (%), ESI: ionización mediante electrospray, Q: cuadrupolo, QqQ: triple cuadrupolo, MS/MS: espectrometría de masas en tándem, NCI: ionización química negativa, efl.: efluente, infl.: influente.

Tabla II.18. Continuación.

ANALITOS	MUESTRA	PRETRAT.	ACOND.	CARTUCHO	LAVADO	ELUCIÓN	DETECCIÓN	R (%)	REF.
PFCAs (C6-C10) PFSA _s (incluido PFOS)	9 L (mar)	-	200 mL MeOH 50 mL Milli-Q	Chromabond FR-P (1,7 g)	50 mL Milli-Q	50 mL MeOH (5mM NH ₄ OAc y 2,5 mM AcOH) Sentido inverso	LC-(ESI)-MS/MS	67-109 (mar)	[315]
PFCAs (C4-C12) PFSA _s (incluido PPFOS)	100 mL (río y grifo)	pH 7-8	2 mL acetona:ACN:CH ₂ O ₂ (50:50:1) 3x2 mL Milli-Q (pH 8)	Strata X (200 mg)	-	4x2 mL acetona:ACN: CH ₂ O ₂ (50:50:1)	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	33-100 (Milli-Q)	[285]
PFCAs (C8, C10) PFSA _s (incluido PFOS)	250 mL (efl., estuario, lago, río)	pH 3	5 mL MeOH 5 mL Milli-Q	Supelclean ENVI-18 SPE (500 mg, RP- C ₁₈)	1 mL Milli-Q	6 mL MTBE:MeOH (1:1) 6 mL MTBE:MeOH (1:4) 6 mL MeOH	LC-(ESI)-MS (IT)	78-81 (Milli-Q) 55-109 (río) 42-104 (efl. industrial) 58-106 (efl. EDAR) 69-73 (estuario) 81-103 (lago)	[217]
PFCAs (C4-C12) PFSA _s (incluido PFOS)	40 mL (subterránea efl.)	-	10 mL MeOH 50 mL agua	Sep Pac Vac tC ₁₈ (1 g)	-	5 mL MeOH	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	105-110 (Milli-Q)	[530]
PFCAs (C8-C11, C13)	40 mL (grifo)	-	10 mL MeOH 5 mL agua grifo filtrada	Sep Pac Vac tC ₁₈ (1 g)	5 mL agua (40 % MeOH)	5 mL MeOH	LC-(ESI)-MS/MS (QqQ)	77-125 (grifo)	[531]
PFCAs (C5-C12) PFSA _s (incluido PFOS) PPFAS	500 mL (grifo)	pH 7 (CH ₂ O ₂)	3 mL MeOH (0,1 % 1- MP) 3 mL MEQH 3 mL Milli-Q	CUOAX256 (500 mg)	1 mL MeOH	8 mL MeOH:ACN (80:20, 2 % 1-MP)	LC-(ESI)-MS/MS (QToF)	45-97 (grifo)	[532]
PFOS	200 mL - 1 L (estuario)	filtración membranas de fibra de vidrio (0,22 µm)	10 mL MeOH 10 mL AcOH (1 %)	GracePure™ C ₁₈ -MAX (500 mg)	10 mL Milli-Q	5 mL MeOH	LC-(ESI)-MS/MS (QToF)	95-98	[322]

Pretrat.: pretratamiento, acond.: acondicionamiento, R: recuperación (%), efl.: efluente, infi.: influente.

elución de los analitos se realiza en una columna cromatográfica con un papel de filtro para evitar el paso de la resina al interior. Entre los resultados obtenidos, la resina XAD-7 es la que proporciona mejores recuperaciones de los analitos (C7 - C9) con niveles comprendidas entre un 77 y 120 % [528].

Entre los adsorbentes no poliméricos destacan principalmente los de sílice enlazada en modo fase reversa (C₁₈) [213,217,296,309,318,530,531,533-536] para la extracción de PFASs en diversas muestras de acuosas. Una de sus aplicaciones más actuales ha sido en la investigación realizada por Dong et al. [318] donde se extraen 500 mL de muestra (agua Milli-Q, agua de grifo, residual y río) sin ajuste de pH. Se emplearon 10 mL de metanol seguidos de 10 mL de agua Milli-Q como disolventes de acondicionamiento del cartucho, tras el paso de la muestra se realiza una etapa de secado de 3 horas de duración, y por último se emplea metanol como disolvente de elución de los analitos de interés (C8 - C10 y PFOS). Se evaluaron las recuperaciones para las diferentes muestras obteniendo recuperaciones satisfactorias comprendidas entre 81 y 120 % para los mencionados compuestos.

En otras ocasiones se evaluó el uso de mezcla de adsorbentes como C₈ o C₁₈ con otro tipo de materiales intercambiadores, obteniendo en todos los casos valores de recuperaciones satisfactorios [322,532].

C. Retardantes de llama

Debido a las características físico-químicas (alta lipofilicidad) de estos contaminantes las técnicas de preparación de muestra para matrices acuosas no han sido muy empleadas hasta la fecha; sin embargo, se ha demostrado la presencia de los mismos en diversas matrices acuosas (ver Sección II.1.3.5). Entre las diferentes técnicas de extracción, la SPE ha sido una de las más recurridas empleando diferentes materiales adsorbentes como: C₁₈ [446,537], Carbograph-1 (carbón grafitizado) [427], resinas macroporosas (XAD-2 y XAD-4) [382,457,459-461,494,496] u Oasis® HLB [538].

Entre las anteriores, destaca una investigación basada en la determinación de PBDEs (BDE-47, 99, 100, 153 y 154) y TBBPA en diferentes muestras de aguas (río, residual, grifo) mediante un estudio comparativo de tres tipos de materiales adsorbentes: Oasis® HLB (200 mg), C₁₈ (250 mg) y Carbograph-1 (250 mg). En una prueba inicial realizada con agua Milli-Q, pasando 1 L de muestra y eluyendo los analitos mediante la adición de 7 mL diclorometano:metanol (80:20, para HLB y C₁₈) o 7 mL diclorometano:metanol:AcOH (88:10:2, para Carbograph-1), los resultados muestran mayores niveles de recuperación con

el adsorbente Carboxgraph-1 con niveles comprendidos entre 89 y 99 %, mientras que para los otros dos materiales los niveles son notablemente inferiores (67 - 93 % y 58 - 92 % para Oasis® HLB y C₁₈, respectivamente). No obstante, tras la aplicación a muestras reales, estos valores experimentan una caída significativa con muestras de río (13 - 76 %), mientras que con el agua de grifo (81 - 88 %) la recuperación sigue siendo satisfactoria. Después de unos experimentos, se confirma que esta diferencia es debida a las interacciones entre los compuestos hidrofóbicos con los coloides presentes en las muestras de mayor contenido en materia orgánica, por tanto se recurrió a otras técnicas de extracción como LLE para realizar la extracción de las matrices más complejas, generando recuperaciones para muestras de agua de río comprendidas entre 78 y 92 % [427].

Labadie et al. [451] desarrollaron un nuevo material extractante de modo mixto constituido por la combinación de un adsorbente hidrofóbico (mezcla homogénea de C₁₈ y SAX, 500 mg de cada uno) y un adsorbente de intercambio aniónico en base de sílice (MAX, 150 mg) a fin de superar los efectos negativos producidos por el carbono orgánico disuelto. Este material se empleó para la extracción de PBDEs (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209) y TBBPA en agua de río. Las muestras de río filtradas previamente y sin ajuste de pH (normalmente comprendido entre 7,8 - 8,2) se hacen pasar a través del material, seguido de una etapa de secado de 1 hora y la posterior elución de los analitos con 3 mL acetona, 12 mL hexano:acetona (1:1) y 13 mL diclorometano:metanol:CH₂O₂ (95:4,5:0,5). Las recuperaciones obtenidas con este nuevo material fueron comparadas con la extracción empleando únicamente C₁₈ (con muestra a pH 2 y pH 8), adsorbente modo mixto MAX y la combinación de C₁₈ y SAX; sin embargo, ha sido la disposición bicapa de C₁₈+SAX con MAX la que generó mejores resultados comprendidos entre un 56,6 y 100,8 % para todos los PBDEs, mientras que para las anteriores se encuentran comprendidas entre 13,8 - 32,3 % (C₁₈ pH 2), 11,4 - 39,7 % (C₁₈ pH 8), 23,4 - 42,9 % (MAX) y 46,9 - 90,4 % (C₁₈+SAX).

En otra de las investigaciones realizadas se procede a la extracción de algunos PBDEs (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 y 209), NFRs (EHTBB, BTBPE, DBDPE y DEHTBP) junto con muchos más compuestos (FRs organofosforados, bromofenoles, bromoanilinas, bromotoluenos y bromoanisoles) de muestras de agua empleando Oasis® HLB (60 mg) como material adsorbente. El acondicionamiento del material se realizó con 10 mL diclorometano, 10 mL metanol y 15 mL Milli-Q, haciendo pasar a continuación 100 mL de muestra sin filtrar. Se realiza una etapa de lavado con 5 mL de agua Milli-Q seguida de una etapa de secado durante 30 min. La elución de los analitos de interés se llevó a cabo mediante la adición de 10 mL de diclorometano:hexano (1:1), seguidos de 10 mL diclorometano:acetona (1:1). Las recuperaciones obtenidas tanto para los PBDEs como para

NFRs han sido satisfactorias con niveles comprendidos entre 87 y 124 % y entre 61 y 119 %, respectivamente [538].

2.1.3 Técnicas de microextracción

Durante los últimos años, los seres humanos han comenzado a tomar consciencia de las consecuencias que pueden originar algunos de nuestros actos sobre el medioambiente. Se introduce en 1991 el término de Química Verde o Química Sostenible como una filosofía química dirigida hacia la reducción del uso de residuos o productos químicos tóxicos o perjudiciales tanto para materiales, personas y medioambiente, con el objetivo de minimizar la contaminación. Con este objetivo en mente, surge un movimiento en el campo de la química analítica y principalmente el campo de la preparación de muestra que se centra en el desarrollo de novedosas técnicas que tienen como objetivo: un menor consumo de disolventes orgánicos, la disminución del tiempo de preparación de la muestra, una reducción de la cantidad de muestra necesaria para la extracción, minimizar el tratamiento de la muestra intentando combinar las etapas de extracción con las de limpieza... Surgen así las técnicas de microextracción como alternativa a los procedimientos de preparación de muestra más clásicos.

Las técnicas de microextracción son consideradas procedimientos no exhaustivos ya que el objetivo no consiste en la extracción total de los analitos presentes en la muestra, sino en alcanzar el equilibrio, de un modo reproducible, entre la cantidad de analito presente en la fase extractante y la muestra. Estas técnicas no exhaustivas presentan dos etapas (Figura II.5) bien diferenciadas explicadas con detalle a continuación:

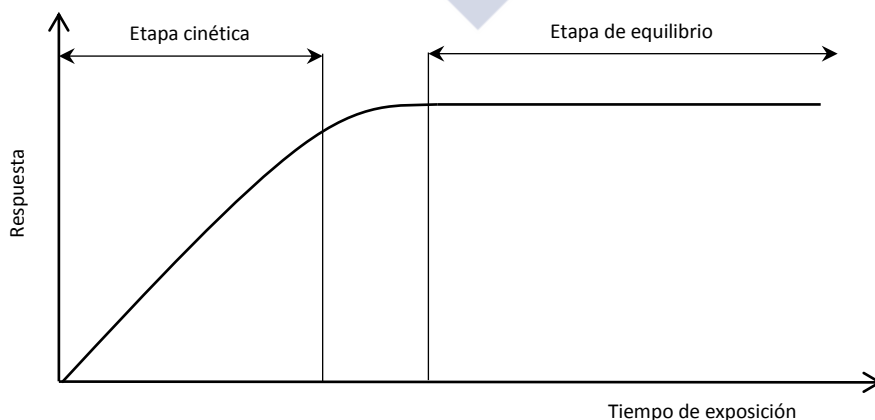


Figura II.5. Etapas en las técnicas de extracción no exhaustivas.

- **Etapla cinética o de no equilibrio.** Etapa en la que se determina la velocidad a la que se alcanza la máxima respuesta. En procesos con extracciones lentas suele trabajarse en esta zona sacrificando la región de máxima sensibilidad (etapa de equilibrio). Los factores que afectan a la cinética de extracción de los analitos en esta etapa son principalmente la difusión de los analitos desde la matriz hacia el material extractante, la agitación, y la superficie y geometría del material extractante. El primero de los factores está regido por la constante de difusión y por las características del medio; sin embargo, los otros dos factores pueden modificarse favoreciendo el alcance de la interfase con mayor rapidez.
- **Etapla termodinámica o de equilibrio.** Etapa regida por las constantes de distribución, encargadas de establecer la cantidad máxima de analito a extraer bajo unas condiciones determinadas. Factores que afectan a dicha constante, como temperatura, fuerza iónica, pH..., pueden ser modificados para maximizar la cantidad de analito extraída en el equilibrio. También pueden realizarse reacciones para modificar las propiedades del analito favoreciendo de este modo su afinidad por la fase extractante [539].

A continuación, se presenta una clasificación de la técnicas de microextracción actualmente desarrolladas [540] en función de la naturaleza de la fase aceptora (líquida o sólida) empleada, junto con una breve descripción para cada una de ellas, haciendo hincapié en las evaluadas en la presente Tesis Doctoral: MASE y microextracción con ad/absorbentes poliméricos de bajo coste.

Microextracción en fase líquida

La microextracción con disolvente (*Solvent microextraction*, SME) se ha convertido en los últimos 15 - 20 años en una de las formas más simples y fáciles de limpieza y preconcentración de microcontaminantes orgánicos. Se basa en los principios de la LLE y se aplica a volúmenes muy pequeños tanto de muestra como de disolvente extractante. En la práctica, existen varios procedimientos de SME dependiendo de si el material extractante se pone en contacto directo con la muestra o a través de una membrana.

A. *Microextracción con gota suspendida (Single-drop microextraction, SDME)*

Ha sido la primera técnica desarrollada de SME (1996), basa su mecanismo en la exposición de una gota de disolvente orgánico (material extractante) suspendida en el extremo de la aguja de una microjeringa a la muestra acuosa. Una vez alcanzado el equilibrio de distribución entre ambas fases, se retrae la gota en el interior de la jeringa y se procede a su inyección en el sistema cromatográfico. Normalmente, suelen emplearse entre 1 y 4 mL de muestra, 0,3 y 3 μL de disolvente orgánico y tiempos de extracción comprendidos entre 5 y 30 min. Las ventajas asociadas a esta técnica como son la simplicidad, eliminación de problemas de contaminación cruzada, bajo coste, elevada capacidad de preconcentración y reducción significativa de disolventes orgánicos, conllevaron una rápida evolución durante los últimos años. Sin embargo, algunas desventajas asociadas a esta técnica han sido la posible formación de emulsiones que pueden originar la disolución de la gota en matrices muy complejas junto con la baja estabilidad de la gota [541-543].

Esta técnica ha sido empleada por Fiamegos et al. [544] para la determinación de disruptores endocrinos fenólicos (incluyendo MeP y triclosán) en matrices acuosas. Tras la optimización de diversos factores, el procedimiento se realiza suspendiendo 2 μL del disolvente extractante (cloroformo:octanol 1:1 con etilcloroformiato) en 3 mL de muestra, con adición de un agente formador de pares iónicos y una disolución tampón (pH 10,5). Estas condiciones favorecen la desprotonación de los grupos fenólicos permitiendo la formación de un nuevo par iónico con el catión del par iónico adicionado, favoreciendo la difusión a través de la interfase líquido-líquido hacia la fase orgánica; los fenolatos reaccionan entonces con el etilcloroformiato originando un compuesto neutro que queda retenido en esta fase. Después de una exposición durante varios minutos, la gota se retrae y se procede a su inyección en el cromatógrafo de gases. Las recuperaciones relativas obtenidas para todos los analitos estudiados se encuentran comprendidas entre 75 y 108 %, alcanzando LODs entre 200 y 1.300 ng L^{-1} para GC-MS y entre 8.500 y 26.500 ng L^{-1} para GC-FID (detección por ionización en llama). Saraji et al. [545] también seleccionaron esta técnica para la extracción de algunos parabenos (MeP, EtP, *i*-PrP, *n*-PrP y *n*-BuP) a partir de muestras de río con proximidad a zonas de descarga de efluentes. Se suspenden 3 μL del disolvente orgánico extractante en la muestra (filtrada previamente con filtros de membrana de nylon de 0,45 μm) bajo agitación magnética. Al finalizar la extracción, se introduce el agente derivatizante (N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida, BSA) en la microjeringa, manteniendo el contacto con el extracto durante un par de minutos hasta su inyección en el sistema GC-MS. Este método permite obtener factores de enriquecimiento

desde 23 hasta 150, con recuperaciones relativas superiores al 81 % para todos los analitos y LODs comprendidos entre 1 y 15 ng L⁻¹.

Hasta la fecha, esta técnica de preparación de muestra no ha sido aplicada para la extracción de los PFASs de matrices acuosas.

En cuanto a la aplicación para la extracción de FRs, esta técnica se empleó una única vez de la mano de Li et al. [546] para la determinación del BDE-209 a partir de muestras de aguas de grifo y lago. La extracción óptima se logra a partir de la suspensión de una gota de tolueno en la muestra sin filtrar (sin adición de sal ni variación de pH), manteniendo la extracción bajo agitación magnética. Las recuperaciones relativas obtenidas se encuentran comprendidas entre 92 y 104 % para ambos tipos de aguas, con desviaciones estándar relativas no superiores al 4,4 % y LODs del orden de 700 ng L⁻¹ tras la inyección en el sistema LC-UV.

B. Microextracción líquido-líquido dispersiva (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)

Desarrollada en 2006 por Rezaee et al. [547], está basada en la rápida incorporación a una muestra líquida de una mezcla de dos disolventes: el extractante inmiscible con la muestra (normalmente 10 - 50 µL y de alta densidad (clorobenceno o cloroformo)) y el dispersante miscible (0,2 - 5 mL, normalmente acetona, metanol, etanol o acetonitrilo). Como consecuencia de la rápida incorporación, se crean una niebla de microgotas de la fase extractante en la disolución, que conlleva un incremento de la superficie específica y favorece la concentración de los analitos en su interior. El disolvente enriquecido se separa por medio de un proceso de centrifugación (recogiendo la gota) o congelación (dependiendo de la densidad, en este caso se conoce como DLLME basado en la solidificación de una gota orgánica (DLLME-SFO, *DLLME based on the solidification of a floating organic drop*)) procediendo a su inyección directa en el sistema. La principal ventaja de esta técnica se basa en la reducción del tiempo de extracción; ya que al aumentar la superficie de contacto se alcanza antes el equilibrio. Sin embargo, su desventaja reside en el limitado número de disolventes extractantes a emplear y la dificultad para su automatización [540].

Esta técnica de extracción ha sido empleada en cuantiosas ocasiones para el análisis tanto de parabenos como de triclosán en muestras de agua con excelentes

resultados [548-560]. Jain et al. [561] desarrollaron un método de DLLME para la determinación de algunos parabenos (MeP, EtP, *n*-PrP y *n*-BuP) en varias matrices, incluyendo muestras de agua de río, grifo, bebidas y residual, mediante una derivatización *in situ* con cloroformiato de isobutilo (IBCF). El procedimiento se realiza con muestra filtrada adicionando el agente derivatizante (piridina (Py) como catalizador), etanol (disolvente de dispersión), cloroformo (disolvente extracción), seguida de unos segundos de agitación en vórtex y una etapa de centrifugación. Las recuperaciones relativas obtenidas para todos los tipos de aguas estuvieron comprendidas entre 90 y 101 %. También se desarrolló un procedimiento para la determinación de triclosán y su compuesto metilado (MTCS) en matrices acuosas (río, grifo, efluente e influente). En este caso, se emplean alícuotas de 10 mL de muestra empleando MTBSTFA (*n*-metil-*n*-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida) como agente derivatizante, metanol (disolvente de dispersión) y 1,1,1-tricloroetano (disolvente extracción), seguida de una agitación manual y de una etapa de centrifugación. Las recuperaciones relativas obtenidas son satisfactorias para todas las matrices evaluadas con valores comprendidos entre un 94 y 103 %, obteniendo también LODs del orden de 2 ng L^{-1} [174]. Reddy et al. [562] incorporaron una etapa de agitación empleando un sistema de ultrasonidos para facilitar la emulsión del disolvente de extracción en el medio acuoso favoreciendo de este modo la transferencia de los analitos (disruptores endocrinos fenólicos) al medio orgánico; obteniéndose recuperaciones relativas superiores al 84 % en influentes y al 93 % en efluentes con LODs comprendidos entre 8 y 230 ng L^{-1} para los analitos de interés (MeP, EtP, PrP, BuP).

En el caso de los PFASs, sólo existen un par de estudios donde se haya aplicado esta técnica para su preconcentración a partir de muestras de agua. En uno de ellos, se sitúa en el tubo cónico, donde tiene lugar la extracción, la muestra filtrada (0,2 μm filtro membrana de nylon, pH 6, sin sal) con un reactivo formador de pares iónicos que actúa como agente derivatizante (30 mM de hidrogeno sulfato de tetrabutilamonio (TBAHS)); adicionando la mezcla binaria de cloroformo y etanol que actúan como agentes extractante y dispersante, respectivamente. Tras un tiempo de extracción (incluyendo centrifugación y agitación) se inyectan 2 μL del extracto en el GC acoplado a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), lográndose recuperaciones relativas de los PFACs (C7 - C10) comprendidas entre un 90 y un 98 % con LODs inferiores a 51 ng L^{-1} [295]. El segundo estudio emplea 1-undecanol y metanol como extractante y dispersante, respectivamente, para concentrar mediante DLLME-SFO una gran variedad de analitos entre los que se encuentran algunos parabenos (MeP, EtP y PrP) y PFASs (PFACs (C6 - C8) y PFOS) a partir de aguas de río y grifo (pH 1, sin sal). Para favorecer la formación de las microgotas se introduce el tubo cónico en un baño de ultrasonidos, seguido de una etapa de centrifugación (*ultrasonic-assisted DLLME*, UA-DLLME). Finalmente, de los datos obtenidos

tanto de las eficacias de extracción como de los LODs tras la inyección en el sistema LC-MS/MS, se puede decir que este procedimiento genera mejores resultados para los PFASs (105 % y LODs < 27 ng L⁻¹) que para los parabenos (hasta 77 % y LODs < 343 ng L⁻¹). Los factores de enriquecimiento son similares para ambas familias con valores comprendidos entre 45 y 142 [284].

Hasta la fecha parece que no existen numerosas aplicaciones de esta técnica para la extracción de los NFRs, únicamente un método desarrollado con los isómeros del DP [464]; sin embargo, sí que existen algunos estudios realizados con los FRs más clásicos (PBDEs) [443,447,454,563,564]. Zhang et al. [443] desarrollaron un método basado en UA-DLLME para lograr la extracción de varios PBDEs (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 y 209) a partir de muestras de ríos y lagos, empleando para ello acetona (dispersante) y tetracloroetileno (extractante). La mezcla permanece durante un par de minutos en el baño de ultrasonidos seguido de una centrifugación; inyectando finalmente en el sistema GC-MS 2 µL del extracto. Mediante este procedimiento se alcanzaron factores de enriquecimiento de hasta 1.050, LODs inferiores a 2,2 ng L⁻¹ y recuperaciones relativas comprendidas entre 71 y 105 % para ambos tipos de aguas. Por otro lado, Li et al. [447] además de desarrollar un método de DLLME para la extracción del BDE-209, realizaron un estudio comparativo frente a procedimientos de SDME y microextracción en fase sólida. La metodología de extracción DLLME optimizada genera LODs de 200 ng L⁻¹, recuperaciones relativas de hasta 96 % y factores de enriquecimiento de hasta 153, al emplear tetracloroetano (extractante) y THF. Finalmente, DLLME resulta ser la técnica más favorable para la extracción de este compuesto, no sólo por la simplicidad, rapidez y bajo coste, sino también por obtener menores desviaciones estándar relativas (RSD (%) < 2,1 %) y emplear pequeños volúmenes de muestra (5 mL).

C. Microextracción por emulsión asistida por ultrasonidos (Ultrasound assisted emulsification-microextraction, USAEME)

Esta técnica combina los principios de la DLLME con los de la LLE asistida por ultrasonidos. Este nuevo procedimiento prescinde del uso del agente dispersante, promoviendo la emulsión del agente extractante con la muestra mediante la aplicación de radiación de ultrasonidos. La sonicación aumenta el área de contacto entre el disolvente extractante y en consecuencia genera una mayor transferencia de masa. Al igual que en DLLME, una vez finalizada la extracción tras un tiempo controlado de irradiación, se centrifuga la muestra y se recoge el disolvente enriquecido (fase sedimentada) para su

posterior inyección en el sistema [565]. Su simplicidad operacional, bajo coste, rapidez y eficacia son algunas de las ventajas que ofrece esta técnica.

Su aplicación a la detección de analitos ha sido muy variada, entre los que destacan la detección tanto de parabenos y triclosán [160,559,566,567], como de algunos FRs; sin embargo, no existe hasta la fecha ningún trabajo realizado para la determinación de PFASs en matrices acuosas. Regueiro et al. [160] desarrollaron un método para la extracción de cuatro parabenos y triclosán al mismo tiempo que dos clorofenoles relacionados. Emplearon volúmenes de muestra de 10 mL y 100 μ L del disolvente extractante (1,1,1-tricloroetano) combinado con 200 μ L de anhídrido acético para lograr la derivatización *in situ* de los analitos. La extracción se realizó durante 5 min en un baño de ultrasonidos (40 kHz, 100 W), seguida de la etapa de centrifugación durante 3 min a 3.000 rpm para lograr la sedimentación de la fase extractante. Su análisis se realizó mediante la inyección en un sistema de GC-MS/MS donde se obtuvieron recuperaciones relativas comprendidas entre 85 y 100 % y LODs comprendidos entre 4 y 28 ng L⁻¹. Un estudio más reciente, realizado por Cacho et al. [559] compararon las respuestas obtenidas tras la extracción de algunos parabenos (MeP, EtP, PrP, *n*-BuP e *i*-BuP) a partir de muestras acuosas empleando DLLME y USAEME. En este caso, tras la optimización de distintos parámetros es la DLLME la que proporciona mejores resultados con recuperaciones relativas comprendidas entre un 85 y 120 %, con LODs inferiores a 8,1 ng L⁻¹ tras la inyección en el sistema GC-MS.

En el caso de los FRs, esta técnica únicamente se aplicó para la determinación de algunos PBDEs en muestras de aguas, pero hasta la fecha no existe ningún estudio con los NFRs. Fontana et al. [568] emplearon 10 mL de muestra de agua de grifo, lago y río para la extracción de algunos PBDEs (BDE-47, 99, 100 y 153), utilizando 100 μ L de cloroformo como disolvente extractante. Después de un baño de ultrasonidos de 5 min, se realiza la centrifugación de la mezcla a 1.500 rpm durante 2 min, recogiendo la fase orgánica para su posterior inyección en el sistema GC-MS. Las recuperaciones relativas obtenidas para los tres tipos de muestras de agua estudiadas se encuentran comprendidas entre un 95 y 106 %, generando LODs inferiores a 2 ng L⁻¹.

D. Microextracción en fase líquida asistida con membranas (Membrane-based liquid-phase microextraction, MLPME)

Las técnicas basadas en el uso de membranas han tenido un éxito sustancial en campos como la medicina, biología, química, biotecnología o en el tratamiento de aguas. En

1963, tuvo lugar la primera aplicación de las membranas en la química analítica, descrita por Hoch y Kok [569], quienes emplearon membranas semipermeables compuestas por polietileno y teflón como interfase para el espectrómetro de masas, en el muestreo continuo de gases disueltos en muestras acuosas.

Desde entonces han surgido diversas aplicaciones analíticas basadas en el uso tanto de membranas porosas como no porosas. Los materiales porosos funcionan por lo general como un mero soporte de la fase orgánica. Por el contrario, los no porosos constituyen una parte crucial del proceso de extracción, el cual está gobernado por la velocidad de difusión de los analitos y las posibles interferencias a través de la membrana. Esto significa que estas membranas no son consideradas solamente barreras para las partículas y especies polares, sino que también pueden proporcionar una selectividad y especificidad única. Los materiales empleados con mayor frecuencia en las membranas porosas han sido el polipropileno (PP), politetrafluoroetileno y el fluoruro de polivinilideno (PVDF); mientras que en las no porosas destacan otros como el polietileno de baja densidad (LDPE), el PP de alta densidad, gomas de silicona de polidimetilsiloxano (PDMS) y membranas poliméricas de composición asimétrica, compuestas por una fina capa de silicona y otra barrera de policarbonato (PC) o PP poroso [570].

Las técnicas basadas en la utilización de membranas como método de extracción de analitos presentan una serie de ventajas frente a otras técnicas de extracción, estando consideradas realmente efectivas en cuanto a la reducción del consumo de disolvente y a la posibilidad de eliminar otros compuestos presentes en la matriz que suelen dar lugar a extractos de gran complejidad, simplificando al mismo tiempo en manejo frente a aquellas técnicas que no emplean membranas. A continuación, se discuten los principales tipos de técnicas basadas en el uso de membranas para la determinación de contaminantes orgánicos.

Membranas porosas

○ ***Microextracción en fase líquida con membranas planas (flat sheet, FS).***

Este tipo de membranas pueden emplearse en sistemas de dos fases o tres fases. En los sistemas de dos fases, comúnmente denominados como extracción líquido-líquido con membranas microporosas (*flat-sheet microporous membrane liquid-liquid extraction, FS-MMLLE*) la membrana se emplea como barrera en miniatura entre dos fases, una de ellas orgánica encargada de rellenar los poros situada a uno de los lados de la membrana, y la otra fase es la muestra acuosa, situada en el otro lado de la membrana. Esta técnica emplea

pequeños volúmenes de disolventes, por lo que suele ser utilizada en la extracción de compuestos orgánicos con elevados K_{ow} (compuestos hidrofóbicos) y es altamente compatible con el análisis mediante GC.

Los sistemas de tres fases suelen denominarse como extracción con membranas líquidas (*supported liquid membrane, SLM*); en este caso la membrana se considera como una tercera fase al estar impregnada con un disolvente orgánico, otra fase es la muestra acuosa situada a un lado de la membrana y la última es la fase aceptora acuosa que encuentra al otro lado de la membrana.

○ ***Microextracción en fase líquida con fibra hueca (Hollow-fiber liquid-phase microextraction, HF-LPME)***

El principio de esta técnica de microextracción, introducida en 1999 de la mano de Pedersen-Bjergaard et al. [571], es el mismo que el de las técnicas basadas en FS. Este tipo de fibras pueden presentar diferentes configuraciones: en forma de barra o en forma de U, este último puede ser un sistema de dos (*two-phase HF-LPME*) y de tres (*three-phase HF-LPME*) fases [572]. La principal ventaja reside en el bajo coste de las membranas, lo que permite desecharlas con cada uso suprimiendo posibles problemas de contaminación cruzada; además, este sistema permite una agitación vigorosa de la muestra sin conllevar pérdida del líquido extractante (se encuentra mecánicamente retenido en el interior de la membrana) y proporciona extractos más limpios al evitar el paso de los compuestos de mayor tamaño a través de los poros de la membrana.

Esta técnica de microextracción ha sido empleada en cuantiosas ocasiones para la determinación de los contaminantes recogidos en la presente Tesis Doctoral [572-574]. Esrafil et al. [572] evaluaron los tres tipos de procedimientos anteriores para la extracción de parabenos (MeP, EtP, PrP y ácido 4-hidroxibenzoico) en aguas filtradas de influentes, comparándolos finalmente con un procedimiento de SPE (C_{18}). Cada extracción se realiza con segmentos de fibra de 8 cm y 20 mL de muestra (pH 2, 10 % NaCl). En el procedimiento de dos fases HF-LPME tanto los poros como el lumen se llenan con el mismo disolvente orgánico (1-octanol), en los de tres fases la fibra se impregna con *n*-dodecano y se rellena el lumen con acetonitrilo o con una fase aceptora acuosa (ambas con $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH). Una vez finalizada la extracción (bajo agitación magnética) se recoge la fase aceptora y se realiza una derivatización en el inyector con bromuro de tetrabutilamonio (TBA) para los extractos de la HF-LPME de dos fases y tres fases convencional (inyectado en LC-UV), mientras que los extractos de la HF-LPME de tres fases realizada con disolventes inmiscibles

se inyectaron en el GC-MS. Se obtuvieron recuperaciones relativas satisfactorias para los tres modos de trabajo comprendidos entre un 86 y 103 %, con factores de enriquecimiento desde 117 hasta 317 y LODs inferiores a 2.000 ng L^{-1} para los analitos de interés.

Otro estudio donde se desarrolló un procedimiento de extracción empleando esta técnica es el llevado a cabo por Díaz-Álvarez et al. [574], donde tratan de extraer parabenos de matrices acuosas (pH 4) con fibras de PP. Se calcularon las eficacias de extracción para muestras de río, embalses y agua de mar alcanzando valores comprendidos entre 17 - 46 %, 25 - 65 % y 21 - 69 %, respectivamente; mientras que los LODs obtenidos tras la inyección en el sistema LC-UV (254 nm) son inferiores a 80 ng L^{-1} para todos los analitos, excepto para el BzP ($< 270 \text{ ng L}^{-1}$). Los factores de enriquecimiento en este caso se encuentran comprendidos entre 3 y 16.

El triclosán también se extrajo a partir de muestras de aguas de grifo y río empleando *n*-dodecano para rellenar la fibra, procediendo a su inmersión en la muestra bajo agitación constante. Tras retraer el disolvente de la fibra hacia el interior de una jeringa se procede a su inyección en un sistema de GC-MS, obteniendo porcentajes de recuperación relativa de 84 y 114 % en aguas de grifo y fluviales, respectivamente, con LODs de 20 ng L^{-1} [575].

Hasta la fecha no se han desarrollado investigaciones dedicadas a la extracción de PFASs en muestras de aguas empleando este procedimiento; pero sí se han encontrado un par de estudios sobre la determinación de algunos PBDEs aunque no de los NFRs.

Xiao et al. [576] emplearon la HF-LPME para la extracción de cuatro PBDEs (BDE-28, 47, 99 y 100) a partir de aguas procedentes de lagos. La extracción tiene lugar con 3 mL de muestra (adición 30 % metanol, sin sal) bajo agitación constante a 40°C , usando *n*-decano como extractante; permitiendo obtener factores de enriquecimiento entre 30 y 83. Empleando GC acoplado a MS con plasma acoplado inductivamente (GC-ICP-MS) se obtienen LODs comprendidos entre 15 y 41 ng L^{-1} . También Fontanals et al. [577] emplearon este procedimiento para la extracción de PBDEs (BDE-15, 28, 47, 99, 100, 153, 154 y 183) a partir de muestras de grifo, río y lixiviados. La extracción se realiza introduciendo la fibra con *n*-undecano en la muestra (sin sal ni ajuste de pH) manteniendo una agitación constante, inyectando una porción del extracto en el sistema GC-MS. Los factores de enriquecimiento alcanzados en la extracción son superiores a los obtenidos en los anteriores trabajos, con valores desde 2.800 (BDE-15) hasta 5.200 (BDE-153); mientras que las recuperaciones obtenidas con los tres tipos de aguas son superiores al 87 % y LODs para lixiviados inferiores a $1,1 \text{ ng L}^{-1}$.

Membranas no porosas

Con el uso de las membranas poliméricas no porosas, la velocidad de extracción del analitos (permeabilidad) está determinada por la difusión de los analitos desde la muestra a la fase aceptora, que depende principalmente de la solubilidad del analito y la difusividad a través del material de la membrana. Las membranas no porosas pueden emplearse para dos técnicas de extracción diferentes, que se recogen a continuación.

- ***Microextracción con disolvente asistida por membrana (Membrane-assisted solvent extraction, MASE)***

Conocida también como microextracción líquido-líquido asistida por membranas (MALLE, *membrane-assisted liquid-liquid extraction*), fue desarrollada por primera vez en el año 2001 de la mano de Hauser y Popp [578] para la determinación de compuestos organoclorados a partir de muestras acuosas. Esta técnica, a diferencia de la HF-LPME, emplea una membrana hidrofóbica no porosa de LDPE o PP en forma de bolsa lisa que actúa como barrera separadora entre la muestra acuosa que se encuentra en el exterior de la bolsa y la fase orgánica extractante que se encuentra en el interior, constituyendo un sistema de tres fases: acuosa-polimérica-orgánica. La membrana actúa como una barrera de difusión permitiendo el paso de los analitos pero impidiendo la entrada de otras moléculas, proporcionando un alto grado de selectividad al proceso de extracción. Resulta especialmente adecuada para muestras de gran complejidad con elevado contenido en materia orgánica, aunque no es aplicable a compuestos altamente hidrofílicos con baja capacidad para difundir a través de la membrana. Las cinéticas de extracción pueden ser incluso más lentas que las de HF-LPME, por lo que se recomienda la utilización de temperaturas superiores a la ambiental [578].

Dispositivos comerciales

Las membranas no porosas de PP utilizadas en el sistema MASE son producidas y comercializadas con fines analíticos por la casa comercial alemana Gerstel GmbH (Mülheim an der Ruhr, Alemania). Este sistema ha sido utilizado en diversas aplicaciones, obteniendo buenos resultados en la extracción de compuestos hidrofóbicos a partir de muestras acuosas. Actualmente, las membranas se comercializan en forma de bolsa de 4 cm de largo, 6 mm de diámetro interno y un espesor de fase de 0,3 mm. La Figura II.6 representa un esquema del montaje comercial de MASE [579].

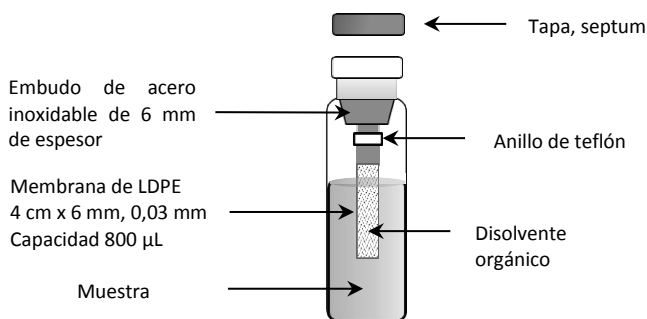


Figura II.6. Montaje comercial de MASE (basada en figura de Barri et al. [570]).

Etapas

En MASE (Figura II.7), la membrana de extracción se fija en un extremo de un embudo metálico con ayuda de un anillo de teflón, y este dispositivo se sitúa sobre la boca de un vial estándar de espacio de cabeza, en el que se encuentra la muestra. Seguidamente, se llena el interior de la membrana con el disolvente orgánico óptimo para lograr la extracción de los analitos (pueden utilizarse disolventes miscibles como inmiscibles con agua ya que la membrana no es porosa) y se realiza la extracción bajo las condiciones óptimas determinadas, normalmente a temperaturas superiores a la ambiental y bajo agitación magnética. Una vez finalizada la extracción, se recoge la fase orgánica, que contiene a los analitos extraídos, para su introducción en el correspondiente sistema de determinación.

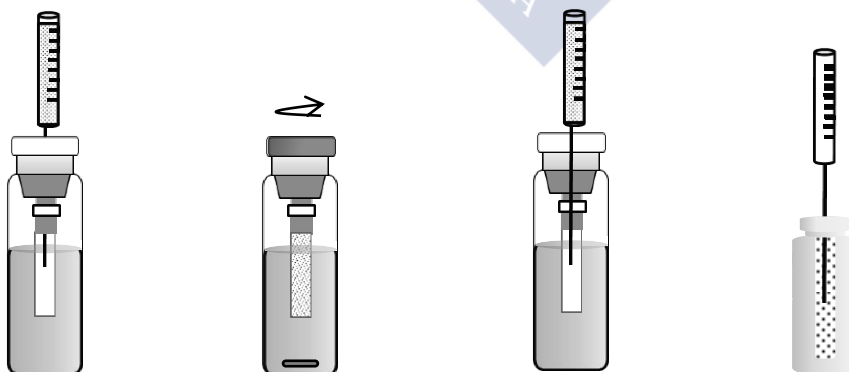


Figura II.7. Mecanismo de extracción de los analitos del procedimiento MASE (basada en figura de Hauser et al. [579]).

Ventajas e inconvenientes

Esta técnica de preparación de muestra presenta la posibilidad de minimizar el consumo tanto de muestra como de disolvente orgánico frente a las técnicas más convencionales, permite la utilización de muestras con alto contenido en materia orgánica, posee gran simplicidad y permite realizar extracciones simultáneamente en función del número de posiciones que presente el sistema de agitación magnético. Las membranas pueden ser además reutilizadas, tras una etapa de limpieza, para posteriores extracciones sin perjudicar a la eficacia del método. La principal desventaja que conlleva esta metodología es la necesidad de efectuar etapas de acondicionamiento de las membranas antes de su primer uso para eliminar posibles sustancias interferentes, empleando para ello volúmenes de disolventes orgánicos superiores a los que requiere la extracción en sí misma.

Aplicación de MASE en matrices medioambientales

Pese a ser una técnica ampliamente empleada para la extracción de contaminantes orgánicos a partir de muestras acuosas; no ha sido desarrollado hasta la fecha ningún procedimiento para la determinación de parabenos y triclosán ni para la extracción de los PFASs empleando esta técnica de preparación de muestra. Por ello, esta metodología ha sido optimizada y desarrollada en la presente Tesis Doctoral para realizar la determinación de parabenos y triclosán en matrices acuosas.

Existe únicamente una investigación realizada para los FRs empleando esta técnica como procedimiento de extracción. Prieto et al. [448] llevaron a cabo un estudio comparativo entre dos técnicas de preparación de muestra: MASE frente a la extracción con barras agitadoras (SBSE), para la determinación de varios contaminantes orgánicos entre los que se encuentran algunos PBDEs (BDE-28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153 y 154) a partir de muestras de agua. En el procedimiento de MASE se emplearon membranas comerciales de PP de alta densidad (4 cm largo, 0,03 mm espesor y 6 mm diámetro interno), situando en su interior acetato de etilo:ciclohexano (50:50) como fase extractante. La extracción se llevó a cabo realizando la inmersión de la membrana en el interior de la muestra con NaCl y metanol, manteniendo la exposición bajo agitación magnética constante a 50 °C. El extracto se inyecta en el sistema de GC empleando un inyector de grandes volúmenes (LVI) y temperatura programada (PTV). Los extractos procedentes de la SBSE se inyectan en un sistema GC-MS tras un programa de desorción térmica (TD) de los analitos. Los resultados obtenidos para los PBDEs (únicamente los de interés en la presente memoria) arrojan recuperaciones relativas similares obtenidas tras las extracciones realizadas con ambas

técnicas comprendidas entre 81 y 121 %. Los LODs parecen ser ligeramente inferiores para la extracción con SBSE, con niveles comprendidos entre 0,03 y 1,7 ng L⁻¹, frente a los obtenidos mediante MASE (entre 0,2 y 5,3 ng L⁻¹).

○ *Extracción con membrana con interfase adsorbente (Membrane extraction with sorbent interface, MESI) y variantes*

La extracción con membranas con interfase adsorbente (MESI) consiste en un sistema de distribución de tres fases: acuosa-polimérica-gaseosa, pudiendo operar tanto en espacio de cabeza como mediante una inmersión directa en la muestra, o gaseosa (aire)-polimérica-gaseosa. Los analitos de la muestra acuosa o gaseosa difunden a través de una membrana polimérica no porosa de forma tubular desde una muestra acuosa o gaseosa que la rodea, hacia el interior, siendo transportados por el gas portador que la atraviesa hasta concentrarlos en una posterior trampa adsorbente, logrando de ese modo el enriquecimiento de los mismos. Finalmente, los analitos son desorbidos térmicamente y arrastrados por la corriente de gas hacia el GC.

El uso de MESI ha estado principalmente dirigido hacia el análisis de contaminantes orgánicos volátiles en muestras acuosas y de aire. Una de las limitaciones de MESI es que no es aplicable para extracciones de compuestos no volátiles polares y apolares debido a los problemas de retención en sistemas de membrana [570].

Microextracción en fase sólida

En este tipo de procedimientos la muestra acuosa a analizar se pone en contacto con un material sólido que actúa como agente extractante mediante mecanismos de ad/absorción. Al igual que las técnicas de microextracción en fase líquida, existe una gran variedad de técnicas cuya finalidad consiste en emplear una menor cantidad tanto de disolventes orgánicos como de muestra, con procedimientos o sistemas cada vez más sencillos. A continuación, se introducen algunas de las técnicas más empleadas.

A. *Microextracción en fase sólida (Solid-phase microextraction, SPME)*

Esta técnica de preparación de muestra fue desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989, convirtiéndose en la primera microextracción comercial exitosa [580]. Se basa en la

utilización de un dispositivo a modo de jeringa en cuyo extremo se sitúa una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria polimérica con propiedades absorbentes, adsorbentes o una combinación de ambas. La fibra se expone a la muestra acuosa o gaseosa a analizar durante un tiempo controlado, normalmente hasta que se establece el equilibrio entre el analito en la muestra y la fibra; realizando a continuación la desorción de los compuestos ya sea mediante TD en el inyector de un GC, o por disolución en un disolvente adecuado para su acoplamiento a LC.

Entre las múltiples ventajas que presenta destacan la simplicidad del procedimiento, el moderado coste (la fibra es reutilizable) y que alcanza un elevado poder de concentración. Entre sus inconvenientes se encuentran las bajas eficacias de extracción, la fragilidad de la fibra y la necesidad de incluir una etapa de pretratamiento en el caso de matrices muy complejas [508].

Esta metodología ha sido empleada en numerosas ocasiones para la determinación de parabenos y triclosán en diferentes tipos de aguas [50,69,154,581-583]. Regueiro et al. [154] desarrollaron un procedimiento de HS-SPME para la determinación de algunos parabenos (MeP, EtP, *n*-PrP y *n*-BuP) y triclosán en muestras de aguas residuales, ríos y piscinas (35 % NaCl, 0,1 g hidrogenofosfato de sodio) y derivatización *in situ* de la muestra con anhídrido acético. Las recuperaciones relativas obtenidas con muestras de efluentes se encuentran comprendidas entre un 86 y un 102 % y LODs inferiores a 17 ng L⁻¹ para todos los analitos. Canosa et al. [50] también optimizaron un procedimiento para la extracción de cinco parabenos (MeP, EtP, *n*-PrP, *n*-BuP y BzP) a partir de diferentes muestras de aguas (pH 6, 150 mg mL⁻¹ NaCl), con poliacrilato (PA) como fase extractante y exposición directa de la fibra. La derivatización de los analitos se realiza a *posteriori* exponiendo la fibra a vapores de MTBSTFA. La metodología desarrollada permite obtener recuperaciones relativas en agua Milli-Q superiores al 87 % con LOQs comprendidos entre 1 y 25 ng L⁻¹.

Aunque empleada con menos frecuencia, también se desarrollaron métodos basados en la SPME para la determinación de PFASs a partir de matrices acuosas [312,584,585]. Alzaga et al. [312] adicionaron un formador de par iónico (TBA) sobre la muestra acuosa mientras mantienen agitación y temperatura constantes. Las recuperaciones relativas obtenidas para los tres analitos estudiados (C7, C8 y C10) oscilan entre el 94 y 120 %, obteniendo tras la inyección en el sistema GC-MS LODs inferiores a 750 ng L⁻¹. Por el contrario, Monteleone et al. [585] seleccionaron una fibra de CAR/PDMS para realizar una HS-SPME de PFCAs (C6 - C12). Realizan una derivatización *in situ* previa a la extracción de la muestra con propil cloroformiato (junto con piridina, tampón de fosfato y propanol), permaneciendo bajo agitación hasta lograr el equilibrio. La desorción de los analitos se efectúa en el inyector del sistema GC-MS/MS sometiendo la fibra a 290 °C 10

min, obteniendo recuperaciones relativas en agua de río comprendidas entre 79 y 124 % con LODs inferiores a 6,6 ng L⁻¹.

Los FRs, aunque exclusivamente los PBDEs, presentan al igual que los parabenos numerosos estudios donde se emplea la SPME para la preparación de la muestra [439-441,444,456,586,587]. Polo et al. [587] expusieron mediante HS-SPME una fibra de PDMS a la muestra (100 °C) bajo agitación magnética para lograr la extracción de algunos PBDEs (BDE-3, 47, 99, 100, 153 y 154) y de algunos PBBs, realizando una desorción térmica con una rampa de temperaturas de 250 a 300 °C en 2 min en el inyector del sistema GC-MS/MS. Las recuperaciones relativas obtenidas para muestras de agua de grifo y residuales fueron superiores a 74 % para todos los PBDEs con LODs de hasta 0,19 ng L⁻¹. Wang et al. [441] desarrollaron una nueva fase extractante para SPME compuesta por nanotubos de carbono para la extracción de cinco PBDEs (BDE-47, 99, 100, 153 y 154). Los factores de enriquecimiento obtenidos para esta fibra (616 - 1.756) son notablemente superiores a los generados por las otras fases, seleccionando por tanto los nanotubos como fase extractante óptima. Las recuperaciones relativas obtenidas con muestras de río y agua residuales alcanzaron niveles superiores al 90 % en ambos casos para todos los analitos con LODs inferiores a 8,6 ng L⁻¹.

B. Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras (Stir-bar sorptive extraction, SBSE)

La SBSE surge en 1999 de la mano de Baltussen et al. [588] como una alternativa a la SPME. Los principios de extracción sobre los que se basa esta técnica son los mismos que los de la SPME, con la diferencia del formato del dispositivo en donde se encuentra fijada la fase móvil. En este caso, el sistema de extracción emplea una barra magnética recubierta del material ad/absorbente, generalmente PDMS, comercializado con el nombre de *Twisters*. La extracción de los analitos tiene lugar al mismo tiempo que se realiza la agitación de la muestra líquida, retirándola al finalizar para una posterior desorción ya sea térmica o mediante el uso de disolventes. La SBSE emplea volúmenes de fase extractante entre 50 y 200 veces superiores a los empleados en SPME, lo que conlleva a un incremento de las eficacias de extracción, y por tanto una disminución de LODs. No obstante, al poseer una mayor cantidad de fase se requieren mayores tiempos en la TD y requiere una interfase especial para su acoplamiento al GC [542,565].

Al igual que la SPME, esta técnica también se ha aplicado en numerosas ocasiones para la determinación de parabenos y triclosán en diversas matrices acuosas

[125,128,132,141,153,181,183,195,589]. Entre ellas destaca la investigación realizada por Casas-Ferreira et al. [128] desarrollada exclusivamente para la determinación de cinco parabenos (MeP, *i*-PrP, *n*-PrP, *n*-BuP y BzP), triclosán y MTCS a partir de muestras de agua. La extracción se realiza con barras de PDMS durante 60 min a temperatura ambiente, después de realizar una derivatización *in situ* de los analitos (ácido acético anhidro e hidrogeno carbonato sódico). Los compuestos se desorben térmicamente (6 min a 275 °C) en el inyector del sistema GC-MS, obteniéndose eficacias de extracción superiores al 79 % (excepto para MeP) y LODs para los parabenos y triclosán inferiores a 4 ng L⁻¹.

Hasta la fecha, no existe ningún estudio para lograr la extracción de los PFASs, ni para los PFCAs ni tan siquiera para el PFOS.

En el caso de los FRs, al igual que con SPME, la SBSE no ha sido utilizada para la extracción de los NFRS a partir de muestras acuosas, sin embargo, sí se ha recurrido a ella en algunas ocasiones para concentrar diferentes PBDEs [442,448-450]. El PDMS ha sido la fase extractante común empleada en las anteriores investigaciones. Serôdio et al. [450] alcanzaron recuperaciones relativas de 117 % en la extracción de once PBDEs (BDE-47, 85, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 197, 206 y 207) a partir de la exposición de barras de PDMS a muestras de agua Milli-Q a pH 5,7 (40 % metanol). La desorción se realiza con acetonitrilo en un baño de ultrasonidos, llevando a sequedad el extracto y reconstituyéndolo en hexano para su inyección en el sistema LVI-GC-MS, lográndose LODs inferiores a 1 ng L⁻¹ para los penta-BDEs, mientras que los octa-BDEs presentan LODs comprendidos entre 16 y 203 ng L⁻¹. Llorca-Porcel et al. [442] realizaron la extracción de nueve PBDEs (BDE-28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153 y 154) de aguas superficiales contaminadas (20 % metanol), obteniendo recuperaciones relativas superiores al 94 % (agua Mili-Q). Los analitos son desorbidos térmicamente en el inyector del sistema GC-MS durante 6 min a 280 °C, obteniendo LODs inferiores a 9,6 ng L⁻¹ para todos los compuestos estudiados.

C. Extracción con polímeros ab/adsorbentes de bajo coste

Esta técnica surge recientemente como alternativa a las técnicas de extracción con ad/absorbentes sólidos existentes hasta el momento, como consecuencia de las limitaciones presentadas en lo referente a la limitada eficacia de extracción originada por el bajo volumen de fase y fragilidad de la fibra (SPME), y el elevado precio de los dispositivos comerciales (SPME y SBSE), que implican su reutilización y en consecuencia la aparición de problemas de efecto memoria con su correspondiente desgaste mecánico y químico. El bajo coste de estos materiales permite la utilización de una nueva fibra o pieza de material en

cada procedimiento de extracción realizado, superando así algunas de las dificultades presentadas por las otras técnicas.

Fundamentos, dispositivos y modos de trabajo

Al igual que en cualquier técnica de microextracción en fase sólida, el objetivo de esta metodología de extracción consiste en lograr la ab/adsorción de los analitos en el cuerpo del material polimérico, siendo el PDMS el material más empleado para este fin [590]. Las primeras aplicaciones en las que se utilizó el PDMS como fase extractante tuvieron lugar en la década de los 80. Las sustancias orgánicas eran extraídas del agua y retenidas en una columna capilar tubular abierta recubierta con PDMS entrecruzado [591,592]. Con el paso de los años, el PDMS fue empleado con frecuencia en las extracciones con SPME o SBSE.

El PDMS como medio de extracción también está disponible en múltiples diseños no comercializados, por ejemplo, películas delgadas de PDMS que se introducen en el recipiente de la muestra, ya sea directamente o en espacio de cabeza (HS) [593]. Tras la extracción, la película de PDMS se sitúa con ayuda de una varilla en el interior del *liner* del GC para realizar la TD. Algunas aplicaciones describen el uso de materiales de silicona como láminas en los dispositivos de muestreo pasivo para la determinación de coeficientes de distribución [594] y pruebas de toxicidad [595].

Otra técnica es la extracción por absorción con barra y tubo de PDMS. Al igual que el *Twister* comercial, se comenzó a emplear material de silicona comercializado para fines industriales en formas de barras y tubos para lograr el enriquecimiento de los compuestos orgánicos [596]. En cuanto a la extracción de los analitos con barras y tubos de PDMS, es similar a la SPME y SBSE pero con la ventaja de ser un procedimiento más barato y flexible, donde no es necesario reutilizar el material polimérico (PDMS u otro material) evitando de este modo problemas de contaminación cruzada. Se han aplicado para la extracción de una gran variedad de microcontaminantes orgánicos siliconas de PDMS en tubo y barra.

Un estudio reciente comparó distintos tipos de materiales disponibles para aplicaciones analíticas e industriales, con el objetivo de evaluar sus potenciales como materiales de absorción; estos han sido: PDMS, polietersulfona (PES), Teflón®, PP, polietercetona (PEEK) y Kevlar® en diferentes formatos como tubos, barras, membranas o láminas. Los mejores resultados fueron los obtenidos con PES en forma tubular principalmente para los analitos más polares [597]. En la Figura II.8 se recogen algunas de las estructuras de los polímeros más ampliamente utilizados.

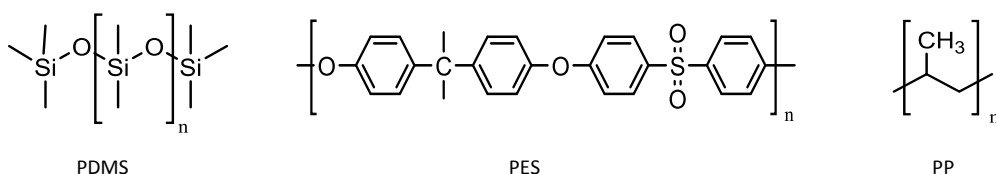


Figura II.8. Estructura de polímeros porosos empleados como ad/absorbentes.

La base teórica de la extracción con ab/adsorbentes es que la partición de los analitos tiene lugar entre la fase polimérica y la muestra de manera idéntica a SPME y SBSE. El conocimiento de los coeficientes de difusión es importante para estimar la partición de los analitos y para el cálculo de las recuperaciones. En la Ecuación 1 se describe la partición de los analitos entre dos fases no miscibles, donde R es la recuperación o rendimiento de la extracción, m_s la masa del analito retenido en la fase polimérica, m_0 la masa total del analito que inicialmente se encuentra solo en la fase acuosa, β es la relación entre fases, siendo $\beta = V_w/V_s$, donde V_s es el volumen de ad/absorbente y V_w el volumen de agua, y K_{sw} el coeficiente de partición entre las fases [598].

$$R = \frac{m_s}{m_0} = \frac{K_{sw}/\beta}{1 + (K_{sw} + \beta)} = \frac{1}{(\beta/K_{sw} + 1)}$$

Ecuación 1. Cálculo de la recuperación o rendimiento de la extracción para técnicas de extracción con ab/adsorbentes.

La recuperación depende de los valores de β y K_{sw} . Niveles elevados de β como resultado de un pequeño volumen de fase extractante frente a la fase acuosa, en combinación con bajos y moderados coeficientes de partición conducen a bajas recuperaciones de los analitos. Para elevados coeficientes de partición la relación entre fases no afecta a la recuperación.

El procedimiento de extracción usando ab/adsorbentes en tubo o en barra es similar al de SBSE y muy fácil de llevar a cabo. Como paso inicial, es necesario cortar las barras o tubos en pequeños pedazos y pesarlas para asegurarse que en cada experimento se emplea el mismo volumen de fase extractante. Se deben eliminar las posibles impurezas que contenga la fibra mediante un lavado con disolventes o por medio de un proceso térmico.

II. INTRODUCCIÓN

Al igual que la SPME y SBSE, se pueden realizar dos modos de extracción diferentes en función del emplazamiento de la fase extractante:

- Modo de inmersión directa: el polímero se introduce en el vial que contiene la muestra líquida en contacto directo con esta.
- Modo espacio de cabeza: el muestreo se realiza suspendiendo el material en el espacio de cabeza del vial y el polímero se encuentra en contacto estático con la fase vapor de una matriz sólida o líquida.

Una vez finalizada la extracción de los analitos de la matriz, se procede a llevar a cabo la etapa de desorción de los analitos retenidos en la fibra. Para ello, al igual que en SBSE y SPME, existen dos modos de trabajo:

- Desorción térmica (*thermal desorption*, TD): es la que se emplea en la mayor parte de las investigaciones realizadas hasta la fecha proporcionando varias ventajas frente a la desorción con disolventes (evita uso de disolventes orgánicos y permite una completa introducción de los analitos en el sistema cromatográfico). No obstante, es necesario un equipo específico para lograr la TD de los analitos. Por otro lado, es necesario tener en cuenta que no es un procedimiento válido para todo tipo de material, puesto que en algunos casos como con el PDMS, la inestabilidad relativa de este material a altas temperaturas, origina un aumento del ruido de fondo encontrándose incluso sus productos de degradación.
- Desorción con disolventes (*liquid desorption*, LD): es una alternativa a la TD cuando se analizan analitos térmicamente lábiles, cuando la separación se realiza mediante LC o electroforesis capilar (CE), o cuando no es posible utilizar un sistema específico de TD acoplado al GC. Para este caso, la fibra se sumerge en el disolvente de extracción o en una mezcla de disolventes, compatibles con la fibra, teniendo lugar la desorción química de los analitos extraídos. El volumen mínimo de disolvente debe ser suficiente como para garantizar la completa inmersión de la fibra. Acetonitrilo, metanol y mezclas de los mismos con agua o tampones acuosos son los disolventes de desorción más comunes, aunque también se han utilizado otros como isooctano [599] y acetato de etilo [600]. La agitación mecánica, el aumento de temperatura o la sonicación pueden acelerar el proceso de LD, que puede combinarse con GC o LC. En el caso de GC se emplean LVIs para introducir el extracto de desorción en la columna, provocando así un aumento de la sensibilidad. La LD permite efectuar reinyecciones [601] y también es útil si en vez de PDMS se utilizan polímeros no termorresistentes.

En la Figura II.9 se recoge un esquema del procedimiento de extracción en espacio de cabeza y por inmersión junto a los diferentes métodos de desorción.

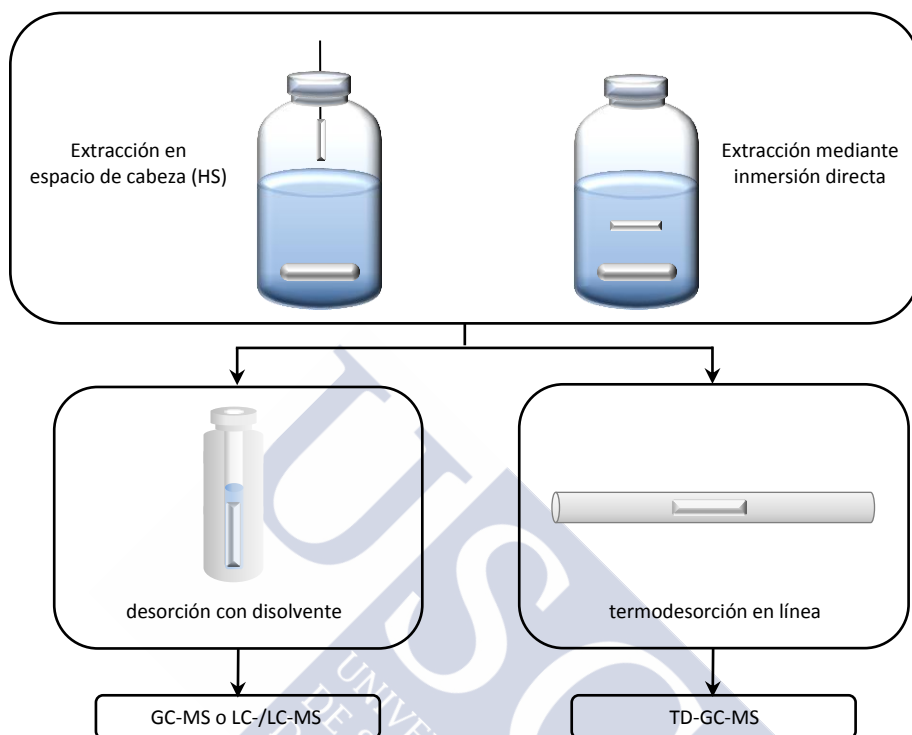


Figura II.9. Procedimientos de extracción y desorción de la técnica de extracción con ab/adsorbentes poliméricos de bajo coste (basada en figura de van Pinxteren et al. [598]).

Finalmente esta metodología de preparación de muestra será empleada en la presente Tesis Doctoral para la determinación de los PFASs y FRs en aguas.

Parámetros a considerar

Del mismo modo que para SPME y SBSE, existen varios factores que pueden llegar a afectar significativamente a cualquiera de las dos etapas que constituyen esta técnica (extracción y desorción); por ello, es necesario conocerlos y efectuar sus respectivas optimizaciones para intentar obtener mejores eficacias de extracción. Se estudiarán por separado para cada una de las etapas, aunque en la bibliografía se suele prestar más atención a los factores que influyen en la extracción [602].

En la etapa de extracción las variables más estudiadas han sido el tiempo de extracción, pH de la muestra, adición de una sal inerte, adición de un modificador orgánico, velocidad de agitación, temperatura de extracción, volumen de muestra y volumen de la fase aceptora. Algunas de estas variables, como el pH de la muestra o la adición de una sal inerte, pueden modificar a los analitos o a las condiciones de la muestra afectando al equilibrio y en consecuencia a otro grupo de variables que pueden afectar a su vez a la cinética de la extracción. A continuación, se recogen en detalle las variables que generan mayor influencia:

- **pH de muestra.** De gran importancia para aquellos analitos con propiedades ácidas o básicas, y en ese caso, se ajusta el pH para obtener, total o parcialmente, el soluto en la forma no iónica intentando lograr la mayor eficacia de extracción posible [603].
- **Salas inertes.** Se suelen adicionar sales como el cloruro sódico para modificar la fuerza iónica de la muestra. En general, se observa que la adición de una sal inerte para los analitos hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 3,5$) no siempre mejora, incluso a veces puede llegar a disminuir, la eficacia de extracción [600,604,605]. Por el contrario, para los analitos polares, siempre que estén en forma neutra, el efecto es el opuesto, se observa un incremento proporcional entre la eficacia con la adición de sal [600]. Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar la disminución de la respuesta de los analitos no polares tras la adición de sal:
 - ✓ La adición causa un efecto oleoso en la muestra que promueve el desplazamiento de los analitos no polares a la superficie del agua, minimizando las interacciones con el material [604,606].
 - ✓ La sal produce un incremento de la viscosidad que reduce las cinéticas de extracción de los analitos [600].
 - ✓ Los iones procedentes de la sal ocupan toda el área superficial del material impidiendo la interacción con los analitos [607].
 - ✓ Producción de interacciones electroestáticas o por par iónico entre los solutos y la sal, lo que reduce la capacidad de movimiento de los analitos [608].
- **Modificadores orgánicos.** Se han probado diversos disolventes para minimizar la adsorción de los analitos en las paredes del vial, aunque el más empleado hasta la fecha ha sido el metanol. No obstante, esta adición puede incrementar la solubilidad en la fase acuosa de los analitos, originando la consecuente disminución de la eficacia de extracción. En general, el metanol evita la adsorción de los solutos en la pared del vial para aquellos analitos con $\log K_{ow} > 5,0$; mientras que para los que tienen $\log K_{ow} < 2,5$ aumenta su solubilidad en la muestra acuosa impidiendo el paso a la fase polimérica [609].

- **Temperatura de extracción.** A temperaturas elevadas se alcanza más rápido el equilibrio de extracción, pero por otro lado esto origina la disminución del coeficiente de partición K_{sw} de los analitos, provocando a su vez la reducción de las eficacias de extracción.
- **Velocidad de agitación.** La agitación de la muestra puede acelerar la etapa de extracción y con ello conseguir incrementar las respuestas a un tiempo de extracción definido. Este hecho se puede explicar mediante la disminución del grosor de la interfase entre el polímero y la fase acuosa. Sin embargo, un aumento de la velocidad de agitación puede causar daños físicos sobre la fase extractante debido al contacto directo de la fibra con el fondo y las paredes del vial de la muestra. Se comprobó que, de manera general, la velocidad de agitación incrementa las respuestas cuando se trabaja con valores comprendidos entre 500 y 700 rpm, pero a niveles superiores tienen un efecto mínimo o incluso no llega a tener ningún tipo de influencia [610]. En ambos casos la falta de homogeneidad en la agitación y las burbujas formadas a elevados niveles son atribuidos a la no mejoría o a los efectos negativos [600].
- **Volumen de muestra.** La relación entre fases es el principal factor del que depende la cantidad de analito extraído. En el caso de volúmenes de muestra elevados provocan la disminución de la eficiencia de extracción, sin embargo, la respuesta cromatográfica puede incrementar debido a un aumento de la masa del analito extraído [611]. Elevados volúmenes de muestra aumentan la respuesta cromatográfica para los analitos no polares ($\log K_{ow} > 3,5$), mientras que para los polares ejerce muy poca influencia [612].
- **Volumen de fase extractante.** Se observa un aumento de la sensibilidad de los analitos más polares (bajos $\log K_{ow}$) al incrementar el volumen de fase polimérica mientras que el aumento es menos significativo para los analitos con mayores $\log K_{ow}$ [613].
- **Tiempo de extracción.** Es una de las variables más estudiadas, normalmente se evalúa cuando el resto de los parámetros de estudio ya se encuentran optimizados, con la intención de conocer el tiempo de equilibrio. Trabajar en equilibrio garantiza una máxima sensibilidad, pero por encima de todo mejora la precisión. Sin embargo, a veces para intentar minimizar el tiempo de análisis, se sacrifica la sensibilidad y la precisión, y se trabaja bajo condiciones de no equilibrio [600].

Las variables que afectan a la etapa de desorción dependen principalmente de si se realiza una desorción térmica o mediante la utilización de disolventes:

- Durante la TD la temperatura de crioenfoque, el tiempo y la temperatura de desorción son las variables más estudiadas, pero la presión y el flujo de venteo también se evalúan en algunas investigaciones.
 - En la LD las variables más estudiadas han sido la naturaleza del disolvente de extracción, el tiempo y el volumen de desorción.
- ✓ **Naturaleza del disolvente.** Acetonitrilo, metanol, agua, tampones acuosos o mezclas de ellos son los disolventes más empleados, pero su selección depende principalmente de los analitos a analizar y su compatibilidad con el polímero empleado como adsorbente.
 - ✓ **Tiempo de desorción.** Si se realiza a temperatura ambiente el tiempo empleado suele encontrarse en el rango de 15 a 30 min, aunque a veces puede realizarse en menos tiempo para minimizar el tiempo de análisis, empleando para ello mecanismos de agitación, sonicación [603] o incrementos de temperatura (50 a 70 °C) [614]. Sin embargo, a elevadas temperaturas se pueden observar cromatogramas más sucios y una menor precisión [615]. Además, la sonicación puede provocar la evaporación del disolvente si los viales no están correctamente cerrados.
 - ✓ **Volumen de disolvente.** Debe ser suficiente para garantizar la completa inmersión de la fibra polimérica. Los volúmenes de disolventes más utilizados se encuentran comprendidos en un rango desde 50 a 200 μL , hasta alcanzar valores máximos de 5 mL.

Ventajas e inconvenientes

Al igual que las técnicas de microextracción en fase líquida, esta metodología permite reducir en gran medida la cantidad de disolvente orgánico y muestra necesarios, junto con la simplicidad que ofrece el sistema. Por otro lado, del mismo modo que para SPME y SBSE, la extracción con materiales poliméricos industriales proporciona numerosas ventajas, como una elevada estabilidad a la temperatura, al agua y a una amplia gama de disolventes orgánicos. Sin embargo, el punto fuerte frente a las dos técnicas anteriores son: una mayor cantidad de fase extractante, que normalmente implica la disminución de los LODs, y el bajo coste del material polimérico (aprox. 5 céntimos por pieza) empleado para la extracción, que permite desecharlo al final de cada procedimiento suprimiendo así posibles

problemas de memoria. Además, el material de extracción se puede ajustar fácilmente a las necesidades específicas de una tarea de extracción, mediante la variación de la longitud y el grosor de las barras y tubos para hacer frente a los diferentes volúmenes de muestra y a la concentración de los analitos. Por tanto, el rango de aplicación es virtualmente ilimitado porque existen disponibles en numerosas longitudes, grosores y con diferentes diámetros.

No obstante, la geometría del material y el incremento de la cantidad de fase ralentizan el proceso de ad/absorción, especialmente en el formato tipo tubo, alcanzando tiempos de extracción superiores (4 a 24 horas) a los de SPME, aunque comparando con los de SBSE son similares. Este inconveniente puede solventarse parcialmente con el uso de agitadores multiposición en los que se puede llegar a realizar entre 15 y 60 muestras a la vez. Por otro lado, al igual que para SBSE no se dispone hasta la fecha de ningún tipo de mecanismo de automatización.

Aplicaciones de la técnica en matrices medioambientales

La idea de utilizar ad/absorbentes en forma de barras o tubos comercializados para otros fines, como técnicas de extracción, surgió tras la publicación de un método de determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en muestras de agua mediante SBSE [616]. Tras esta exitosa aplicación, en 2004 se aplicó el mismo método intercambiando el *Twister* por un segmento de PDMS en barra [617], encontrándose que la barra de PDMS producía los mismos beneficios que el *Twister* (en términos de sensibilidad y reproducibilidad de material) con la ventaja de ser una técnica barata, de un solo uso y de ser un material de extracción altamente flexible. En algunas aplicaciones se investigó la estabilidad a largo plazo de los analitos retenidos en la fase extractante; encontrándose que después del enriquecimiento, los materiales se pueden conservar en el congelador y los analitos permanecen estables hasta 2 semanas. La principal diferencia entre el formato tubo o barra es el alcance del equilibrio más rápido que se obtiene con las formas en tubo frente a las barras (y los *Twisters*) atribuido a la gran superficie específica que ofrecen los tubos [618].

El uso de PDMS como material polimérico ha tenido una gran aceptación y ha sido utilizado en una gran variedad de aplicaciones [596,617-624], sin embargo, una de las principales limitaciones de esta material es la baja afinidad que presenta hacia los analitos de mayor polaridad [597,623]. Desde entonces se han estado evaluando otros materiales como PES [597,625,626] o PP [627,628].

Hasta la fecha de inicio de la presente investigación, la aplicación de los polímeros como material ad/absorbentes para la extracción de los compuestos recogidos en la presente memoria ha sido muy escasa, tanto como para parabenes y triclosán, como para los PFASs. Únicamente existe un estudio con aplicación para seis PBDEs (BDE-47, 85, 99, 100, 153 y 154) llevado a cabo por Montes et al. [620] donde se realiza una extracción con tubos de PDMS (1 cm y 2 mm de diámetro) emplazados en HS de un vial con 80 mL de muestra acuosa. La extracción se realiza durante 14 horas en un horno a 95 °C, seguida de una LD con 1 mL de dietileter durante 5 min sin necesidad de mecanismos adicionales para favorecer la desorción de los analitos. Con este procedimiento se obtuvieron factores de enriquecimientos comprendidos entre 2.000 y 3.000 para todos los compuestos estudiados, eficacias de extracción superiores al 69 % para diferentes tipos de muestras (río, mar, efluente e influente) y se alcanzaron límites de cuantificación inferiores a 5 ng L⁻¹ tras la inyección en el sistema GC acoplado a un detector de captura electrónica (ECD).

D. Microextracción con adsorbentes empaquetados (Microextraction by packed sorbents, MEPS)

Desarrollada por Abdel-Rehim en 2004 [629] como una técnica de microextracción basada en una miniaturización de la SPE, lo que permite una transferencia de los métodos tradicionales de SPE a MEPS, con la única necesidad de reajustar los volúmenes de muestra y disolventes orgánicos necesarios. En este caso se utiliza una menor cantidad de adsorbente (1 - 4 mg) con tamaño de partícula relativamente elevado (40 - 60 µm) para evitar sobrepresiones, y volúmenes de disolventes de elución entre 20 y 50 µL (normalmente metanol, 2-propanol, acetonitrilo o acetato de etilo). El adsorbente se encuentra empaquetado entre dos filtros de PP en el cuerpo de una jeringa de vidrio (100 - 250 µL) o, alternativamente, acomodada en un pequeño cartucho situado entre el cuerpo y a aguja.

MEPS logra reducir los tiempos de preparación de muestra desde varias horas necesarias en SPE a minutos, disminuye el consumo de muestra y disolvente orgánico, puede ser completamente automatizada, pudiendo ser reutilizadas las fases adsorbentes hasta en cien ocasiones. Presenta una automatización más sencilla que la SBSE, más robusta y menos sensible a la naturaleza de la matriz que la SPME. Su principal desventaja reside en la posibilidad de formación de burbujas de aire y las dificultades derivadas de su utilización *off line*, ya que se requiere una velocidad de aspiración baja y constante para conseguir recuperaciones cuantitativas y reproducibles [630-632].

De entre los diferentes analitos estudiados en la presente memoria, únicamente se ha encontrado un estudio realizado por González-Mariño et al. [633] para la determinación de parabenes, triclosán y MTCS en muestras de aguas residuales. Tras la optimización de los diferentes factores, el acondicionamiento del adsorbente (C_{18}) se realiza con 50 μL de acetato de etilo, seguido de la misma cantidad de metanol y agua Milli-Q (pH 3). Se introduce la muestra mediante aspirado de 20 ciclos de 100 μL a un flujo de 5 $\mu\text{L s}^{-1}$ y se procede a realizar la eliminación de las impurezas mediante una etapa de lavado con dos porciones de 50 μL de agua Milli-Q (sin ajuste de pH), seguida por una etapa de secado mediante bombeo de 10 x 60 μL de aire. La elución se realiza con dos porciones de 25 μL de acetato de etilo inyectando directamente el eluato en el sistema GC-MS. Las recuperaciones relativas obtenidas han sido superiores al 86 % tanto para muestras de efluente como influente, con eficacias de extracción con agua Milli-Q comprendidas entre 45 y 102 % (sin corregir) (79 - 104 % corregidas con patrones internos (ISs)). Los LODs oscilan entre 10 a 590 ng L^{-1} para las aguas residuales, mientras que oscilan entre 1 y 15 ng L^{-1} en agua Milli-Q.

2.2 MATRICES SÓLIDAS: MOLUSCOS Y PESCADOS

Esta sección está única y exclusivamente destinada al estudio de las diferentes técnicas de extracción sólido líquido (SLE) exhaustivas empleadas para la determinación de las tres familias de contaminantes recogidas en la presente memoria a partir de muestras de biota, principalmente moluscos y peces. Por tanto, no se hará hincapié en su aplicación a otro tipo de matrices sólidas como sedimentos, lodos, polvo... Se proporcionará una información resumida de cada una de ellas, prestando atención a las ventajas que ofrecen en cada caso y a los factores más comunes empleados.

2.2.1 Soxhlet

Esta es la técnica de extracción de compuestos orgánicos de mayor antigüedad (1879) y con mayor número de aplicaciones, considerada en muchos casos como método estándar de extracción de muestras sólidas, aceptada pese a su antigüedad como método de referencia en la validación de otros métodos de extracción, y utilizada como método oficial por la EPA y la FDA para la extracción continua de sólidos. Se trata de una técnica de extracción exhaustiva en la que se refluje un disolvente orgánico a través de la muestra sólida finamente pulverizada contenida en un cartucho de un material poroso introducido

II. INTRODUCCIÓN

en la cámara del extractor Soxhlet, durante un tiempo determinado hasta la concentración de los analitos en el disolvente. Con el paso del tiempo surgen diversas modificaciones del método original con el objetivo de acortar el tiempo de extracción (extracción Soxhlet asistida por microondas) y automatizar el proceso (extracción Soxtec).

Las principales ventajas de la técnica son el contacto repetido entre la muestra y porciones frescas del disolvente, se favorece la solubilidad de los solutos en el disolvente al trabajar con altas temperaturas, elimina la necesidad de realizar etapa de filtración al finalizar, es simple, independiente del tipo de matriz y produce excelentes recuperaciones. Sin embargo, algunas de sus desventajas residen en el elevado tiempo necesario para la extracción (6 a 24 horas), altas cantidades de disolvente orgánico (50 a 300 mL), necesidad de realizar una etapa de limpieza posterior con matrices complejas, descomposición térmica de los analitos termolábiles, no posibilidad de agitación del sistema, o la necesaria etapa final de evaporación del disolvente y dificultad para automatizar el proceso [508].

En lo referente a la familia de compuestos estudiados, principalmente en muestras marinas, no se han encontrado aplicaciones para la extracción de parabenes, triclosán o los PFASs, aunque sí en otro tipo de matrices sólidas como lodos de depuradoras (6 horas con acetato de etilo) [123,634], sedimentos o algas (6 horas con diclorometano) [188]. Sin embargo, sí ha sido una técnica ampliamente empleada para la extracción de algunos FRs (PBDEs y NFRs) tanto para muestras de animales acuáticos [389,421,422,426,461,463,465,469,472,473,475,480,484,485,489,495,496,498,635] como para otro tipo de muestras como sedimentos [417,463,472,473]. En las muestras de animales marinos el disolvente más empleado en la extracción ha sido la mezcla de hexano y acetona (1:1), y en algunos casos hexano:diclorometano (1:1 o 1:3) tanto para la extracción de los PBDEs como para los NFRs. Destacar alguna investigación como la de Zhang et al. [389] donde realizan la extracción de DP (*syn* y *anti*) y dos compuestos clorados del DP a partir de muestras de tejido blando, hígado y cerebro de peces. Tras el reflujo de una mezcla de acetona:hexano (1:1) durante 48 horas, un posterior procedimiento de limpieza mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) y la inyección en el sistema GC-MS, se generaron recuperaciones de hasta un 105 % para los analitos y LODs comprendidos entre 0,0012 - 0,055 y 0,00052 - 0,024 ng g⁻¹ ww para *syn*-DP y *anti*-DP, respectivamente. Por otro lado, Xiang et al. [495] centraron el estudio en la extracción de varios PBDEs (BDE-28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183 y 209) a partir de muestras de tejido blando de peces y camarones (10 a 20 g). La extracción se lleva a cabo mediante el mismo procedimiento que en el estudio anterior, realizando la limpieza del extracto final con una columna de sílice y alúmina neutra y la elución de los PBDEs con 70 mL de hexano:diclorometano (1:1), obteniendo recuperaciones comprendidas entre un

65 y 120 %. Finalmente, se inyecta el extracto libre de grasa en el sistema GC-MS, generándose LODs comprendidos entre 0,00019 y 0,001 ng g⁻¹ lw para todos los PBDE, excepto el BDE-209 (0,0164 ng g⁻¹ lw).

2.2.2 Digestión alcalina

La digestión alcalina consiste en adicionar una base, normalmente hidróxido sódico o hidróxido potásico en un disolvente como metanol o etanol, a una determinada cantidad de muestra ya homogeneizada, generando la saponificación de los lípidos y la solubilización de los analitos presentes en su composición. Es necesario realizar una etapa de agitación a temperatura ambiente para favorecer este proceso, empleando aproximadamente una media de 16 horas. Una vez finalizada la digestión, se realiza una etapa de centrifugación para recoger el sobrenadante rico en los analitos de interés. En la mayor parte de las ocasiones son necesarias etapas de limpieza posteriores. El principal inconveniente que posee esta técnica en comparación con otras es la cantidad de tiempo que requiere hasta conseguir la extracción final de los analitos [330,636].

Este tipo de procedimiento ha sido ampliamente empleado para la extracción de los PFASs a partir de muestras de biota [286,290,327,330,340,341,343,524,636-638]. Únicamente se ha detectado un estudio con aplicación para algunos FRs [470], sin embargo, no se ha localizado ninguno con parabenos o triclosán para este tipo de muestra. Naile et al. [290] aplicaron esta metodología para la extracción de ocho PFCAs (C4 - C12) y cuatro PFSAs (incluido PFOS) de muestras de moluscos y peces. La extracción de los analitos se realiza mediante la adición de 30 mL de KOH (0,01 N) en metanol sobre 1 g de muestra liofilizada, realizando una agitación de la muestra durante 16 horas a 250 rpm. Una alícuota de 1 mL del sobrenadante se diluye en 100 mL de agua Milli-Q y se procede a realizar una etapa de limpieza mediante SPE (Oasis® HLB 200 mg); obteniendo recuperaciones finales superiores al 75 %, excepto para PFDoA (47 %) a partir de muestras de moluscos, y LODs inferiores a 1 ng g⁻¹ dw tras la inyección en el sistema LC-MS/MS. Moon et al. [470] aplicaron esta metodología para la extracción de veinte PBDEs de muestras (50 g) de mejillones y ostras. La digestión la realizan con una disolución 1 N de KOH en etanol mediante agitación mecánica durante 2 horas. Finalmente, se realiza una LLE con dos fracciones de 150 mL de hexano, y tras la concentración del extracto se realiza una etapa de lavado atravesando una columna de sílice acidificada. Las recuperaciones oscilaron entre un 72 y un 112 % para todos los analitos.

2.2.3 Extracción asistida por ultrasonidos (Ultrasound assisted extraction, UAE)

Esta técnica emplea ondas de ultrasonidos para agitar la muestra sumergida en un disolvente orgánico. Como consecuencia de esta irradiación se produce un aumento de presión y temperatura que favorecen, por un lado, la penetración en los poros de la matriz y el transporte de los analitos, y por el otro, la solubilidad de los analitos en el disolvente y su difusividad. Con esta técnica se reducen los tiempos de extracción (3 a 60 min) frente a otras técnicas (Soxhlet o las digestiones alcalinas), siendo además apta para la extracción de analitos termolábiles puesto que no se alcanzan temperaturas muy elevadas en el proceso. No obstante, es una técnica menos reproducible y su consumo de disolventes orgánicos continúa siendo moderadamente elevado [508].

Esta técnica de extracción no ha tenido una gran aceptación para la determinación de parabenos en muestras de biota, únicamente destaca la investigación realizada por Ramirez et al. [639] donde se aplica para lograr la extracción del triclosán, junto con otros PCPs y fármacos a partir de muestras de hígado (0,5 g) y tejido blando (1 g) de peces. Para ello se empleó como disolvente una mezcla de ácido acético (1 M) en metanol (1:1), manteniendo la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 15 min a 25 °C, recogiendo el sobrenadante tras un posterior proceso de centrifugación para su inyección en el sistema GC-MS/MS.

A diferencia de los PCPs, esta metodología fue empleada en numerosas ocasiones para extraer los PFASs a partir de muestras marinas [8,291,326,329,332,640]. En la mayor parte de los casos el tiempo de sonicación suele estar comprendido entre 20 y 30 min (temperatura ambiente), no obstante este tiempo puede acortarse con un incremento de la temperatura del baño (por ejemplo a 60 °C [640]). En cuanto a los disolventes, el acetonitrilo es el disolvente más empleado aunque también se encuentra algún estudio en el que se extraen con una mezcla de metanol:agua (1:1) [329]. Stevenson et al. [640] lograron recuperaciones superiores al 80 % para siete PFCAs (C5 - C11) y cuatro PFSA's (incluido el PFOS) a partir de muestras de mejillones, después de realizar la sonicación con acetonitrilo (9 mL) a 60 °C durante 10 min. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la necesidad de realizar una etapa posterior de limpieza de los extractos, normalmente mediante un procedimiento de SPE.

Aunque no tan extendida como los PFASs, esta técnica de extracción ha sido aplicada en alguna ocasión para el análisis de FRs en muestras de biota, aunque exclusivamente para los PBDEs [334,466,483]. Kelly et al. [466] realizaron extracciones de quince PBDEs mediante un baño de ultrasonidos durante 20 min con 30 mL de

diclorometano:hexano (1:1) por duplicado, seguido de una limpieza con GPC para su posterior inyección en el sistema GC-MS. Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 40 y el 120 % para todos los analitos con LODs inferiores a $1,9 \text{ ng g}^{-1}$. También se han utilizado otros disolventes como ciclohexano:acetona (20 y 15 mL, respectivamente) con tiempos de sonicación de 2 min a temperatura ambiente, seguida de una etapa de centrifugación durante 10 min a 3.000 rpm, logrando recuperaciones comprendidas entre un 70 y 115 % [483].

2.2.4 Extracción asistida con fluidos supercríticos (*Supercritical fluid extraction, SFE*)

Esta técnica emplea como agente extractante un disolvente en condiciones supercríticas, confiriéndole propiedades intermedias entre un gas y un líquido, que favorecen su penetración en diferentes matrices, y por tanto, la solubilización de los solutos. En comparación con Soxhlet requiere menores tiempos de extracción (de horas a minutos), no es necesaria una etapa de concentración después de la extracción, es altamente selectiva, presenta la posibilidad de extraer compuestos termolábiles y el dióxido de carbono empleado como disolvente no es tóxico ni inflamable. Sin embargo, su limitación reside en la dificultad para extraer compuestos polares e iónicos, en la necesidad de una etapa de limpieza posterior con muestras con un alto contenido lipídico y en una mayor complejidad que las técnicas convencionales [508].

Actualmente, este procedimiento no ha sido aplicado para la extracción de parabenos ni triclosán a partir de muestras de biota; los estudios donde se aplica están principalmente orientados a la detección en cosméticos (parabenos) [641,642] o en lodos de depuradoras (triclosán) [167]. Lo mismo ocurre con los PFASs donde la SFE se empleó en contadas ocasiones para la determinación de esos analitos en muestras de sedimentos [643] y polvo de casa [644].

Aunque no en numerosas ocasiones, esta técnica ha sido utilizada para lograr la extracción de FRs en biota [468,493,497,645]. Rodil et al. [468] introdujeron en la zona inferior de la celda de extracción 1 g de muestra (rodaballo o moluscos) seguido de 1,5 g de alúmina básica y 1,5 g de sílice acidificada, realizando la extracción con CO_2 (165 bar, 60°C , 2 mL min^{-1} , 5 min extracción estática y 17 min dinámica). Los analitos (tres PBDEs, pesticidas organoclorados (OCPs) y bifenilos policlorados (PCBs) retenidos en el módulo colector o la trampa (25°C) se eluyen finalmente con 2 mL de hexano, concentrándolos a $50 \mu\text{L}$ para su inyección en el sistema GC-ECD. Las recuperaciones obtenidas para los PBDEs oscilan entre 76 y 128 %, proporcionando LODs inferiores a $0,70 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$. Se realizó el mismo

procedimiento de SFE con los mismos analitos (PBDEs, OCPs y PCBs), seguido de una concentración mediante SPME con una inyección en el sistema GC-MS/MS, obteniendo recuperaciones totales entre 82 y 101 % y LODs inferiores a $0,0089 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ para los PBDEs [645].

2.2.5 Extracción asistida con microondas (*Microwave assisted extraction, MAE*)

La utilización de energía microondas como fuente de calor fue introducida por primera vez en 1975 en los procesos de incineración húmeda [646]. Sin embargo, no fue hasta 1984 cuando comenzó el interés de la aplicación de la energía microondas sobre preparación de muestra en la química analítica, empleándose para estudios de recuperación y descomposición de matrices biológicas. Se basa en el uso de energía microondas (frecuencias comprendidas entre 300 y 300.000 MHz, siendo la frecuencia 2.450 MHz la más frecuentemente empleada [647]) para calentar el disolvente con la finalidad de desplazar los analitos desde el interior de la matriz hacia el disolvente. Hay dos posibles modos de trabajo, aplicando la energía microondas sobre recipientes cerrados (con presión y temperatura programada, MAE presurizado) y sobre recipientes abiertos (a presión atmosférica, MAE enfocado).

Es una técnica relativamente rápida (menos de 1 hora) comparada con las técnicas clásicas, con un consumo moderado de disolventes (10 a 150 mL) que permite realizar simultáneamente múltiples extracciones (recipientes cerrados), no obstante como desventajas se pueden enumerar la necesidad de localizar un disolvente capaz de absorber las ondas microondas al mismo tiempo que ser capaz de solubilizar los analitos, es necesario esperar un tiempo de enfriamiento de los recipientes para evitar la pérdida de los analitos más volátiles, equipos relativamente costosos, no especialmente selectiva y como principal desventaja es que al tratarse de una técnica con gran poder de extracción es necesaria una etapa final de limpieza del extracto.

La aplicación de MAE a la determinación de los compuestos de interés en muestras de biota es notablemente escasa. En el caso tanto de parabenos y triclosán como de los PFASs, no se ha encontrado ningún estudio que utilice esta técnica para la extracción de este tipo de muestras, sin embargo sí se ha recurrido a ella con matrices sólidas, sedimentos o lodos [648-655], e incluso muestras biológicas [656,657] (para parabenos y triclosán), y en material particulado [658] (PFASs).

En el caso de los FRs, pese a tener un mayor número de aplicaciones con otro tipo de muestras [659-664], existen algunas aplicaciones con animales marinos, aunque exclusivamente para los PBDEs [665-668]. Carro et al. desarrollaron un procedimiento para la determinación de tres PBDEs (BDE-47, 99 y 100) junto con varios PBBs en peces y berberechos. Una vez optimizados los diferentes parámetros, la extracción se realiza con 1 g de muestra (con 1 mL de agua) y 14 mL de hexano:diclorometano (1:1) a 85 °C durante 15 min, seguida de una etapa de limpieza mediante SPE y una concentración posterior mediante HS-SPME hasta su inyección en el sistema GC-MS/MS (LODs 0,3 - 1,94 ng g⁻¹ dw).

2.2.6 Extracción con líquidos presurizados (*Pressurized liquid extraction, PLE*)

La extracción con líquidos presurizados (PLE), denominada también extracción acelerada con disolventes (*accelerated solvent extraction, ASE*), combina la extracción con disolventes a elevadas temperaturas (50 a 200 °C) y altas presiones (1.500 a 2.000 psi), para extraer de forma rápida y eficaz analitos a partir de matrices sólidas. El uso de disolventes líquidos con estas características mejora el rendimiento de las extracciones frente a las realizadas a temperatura y presión atmosférica, puesto que facilita la ruptura del equilibrio analito-matriz e incrementa de la solubilidad y transferencia de masa.

Se trata de un procedimiento rápido, con pocos parámetros a optimizar, un menor consumo de disolventes (típicamente 15 mL por 10 g muestra), etapa de filtrado automática que permite la inyección directa en el sistema, y cuyo dispositivo comercial permite la extracción simultánea de hasta 24 muestras. No obstante, presenta una selectividad limitada y, al igual que las técnicas anteriores, requiere una etapa de limpieza que puede integrarse o no en el proceso de extracción.

Han et al. [669] compararon tres técnicas de extracción (Soxhlet, UAE y PLE) para determinar la presencia de cuatro parabenos (MeP, EtP, PrP y BuP) y tres filtros UV en muestras de peces. La comparación inicial de las tres técnicas (sin optimizar aún la etapa de limpieza) señala a PLE como la que proporciona mejores recuperaciones para todos los analitos con niveles de entre un 91 y 108 %, mientras que UAE y Soxhlet no superan un 85 y 89 %, respectivamente. Finalmente, la aplicación de PLE seguida de limpieza mediante SPE proporciona recuperaciones en peces de hasta 106 % para los parabenos con LOQs de 10 ng g⁻¹ dw. Actualmente, no existe ningún estudio basado en la determinación de los derivados clorados en muestras de biota, aunque sí existe uno para determinar la cantidad de los mismos en lodos de depuradoras [670].

Hasta el inicio de la presente investigación, únicamente Llorca et al. [636] desarrollaron un método de PLE para la extracción de cuatro PFCAs (C5, C8, C9 y C10) y tres PFSA's (incluyendo PFOS) en muestras de peces, tras optimizar algunos de los parámetros que suelen afectar a la eficacia de extracción como temperatura, presión, tiempo estático, tamaño de celda, número de ciclos de extracción y el volumen de descarga. El método PLE-LC-MS desarrollado se compara finalmente con dos procedimientos de extracción empleados frecuentemente (digestión alcalina y extracción con par iónico) generando excelentes recuperaciones de los analitos de interés con valores superiores al 92 % en ambos tipos de muestras, similares a los obtenidos mediante los otros dos métodos de extracción. Los LOQs para PFOA, PFNA y PFOS han sido inferiores a $0,01 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ mientras que los obtenidos para PFDA han sido de $0,05 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$.

A diferencia de las anteriores familias, los FRs (incluyendo los NFRs) se extrajeron en numerosas ocasiones empleando PLE como técnica de extracción a partir de muestras de biota [382,425,471,477,491,502-504,506,507,671-677]. No obstante, la mayor parte de los estudios realizados con muestras de animales marinos aplican métodos previamente desarrollados y optimizados para sólidos o sedimentos (método 3545 [678] y 1614 [679] de la US EPA e ISO 22032:2006 [680]) [457,491,507,671]. Indiferentemente del tipo de FRs (PBDEs o NFRs), la mayor parte de estas muestras se extrajeron mezclando la muestra con un material dispersante: arena, tierra de diatomeas o sulfato sódico anhidro; y se requirieron de etapas posteriores de limpieza, ya sea mediante SPE o GPC. Las recuperaciones obtenidas suelen oscilar en torno al 100 % para todos los analitos.

2.2.7 Dispersión de la matriz en fase sólida (*Matrix solid-phase dispersion, MSPD*)

En 1989 Baker et al. introdujeron un nuevo procedimiento para la extracción de analitos a partir de muestras sólidas basado en la SPE. Este proceso combina aspectos de varias técnicas para conseguir llevar a cabo la ruptura de la muestra [681,682]. La MSPD implica poder utilizar muestras viscosas, sólidas o semisólidas con un soporte sólido o agente dispersante, como la sílice, que puede haber sido derivatizada para producir una fase orgánica ligada, como el C_{18} . Estos materiales son, por supuesto, los mismos materiales que se usaban para las columnas de SPE. En MSPD, estos materiales han sido utilizados de una forma diferente a SPE. De este modo, el soporte sólido posee la misma finalidad que la utilización de arena como abrasivo: se consigue la ruptura de las interacciones de la muestra empleando un mortero u otro mecanismo para conseguir que se rompa la firme estructura de la muestra en pequeñas piezas. Sin embargo, la presencia de los enlaces de la

fase dispersante proporciona una dimensión adicional: los componentes de la muestra se disuelven y se dispersan dentro de los enlaces de la fase dispersante en la superficie de la partícula, llevando a la ruptura completa de la muestra y su dispersión sobre la superficie. Los componentes de la muestra se distribuyen por la superficie en función de sus relativas polaridades: en el caso de usar C_{18} los componentes no polares se dispersan en la fase orgánica no polar en base a sus coeficientes de distribución y los cambios dinámicos que tienen lugar a medida que avanza este procedimiento. Se espera que las moléculas pequeñas de elevada polaridad (agua) se asocien con los silanoles en la superficie de la partícula de sílice y en el interior de los poros del soporte sólido de sílice, así como con los componentes de la matriz capaces de unirse a hidrógenos; y que las moléculas grandes menos polares se distribuyan a través de la superficie de la bifase, fase ligada/estructura lipídica de la muestra dispersada [682].

Etapas de la MSPD

El funcionamiento o el protocolo clásico de MSPD consta de las siguientes etapas, recogidas de forma gráfica en la Figura II.10:

- **Dispersión de la muestra.** La muestra líquida, sólida, viscosa o semisólida se sitúa en un mortero de vidrio o ágata (la porcelana u otros materiales porosos pueden producir pérdidas de los analitos) donde se dispersa mecánicamente con un soporte sólido utilizando el pistilo para lograr la completa disgregación de la muestra. La cantidad del agente dispersante dependerá del tipo de muestra (normalmente cantidades en torno a 0,5 g), presentando generalmente una proporción muestra:agente dispersante comprendida en un rango desde 1:1 hasta 1:4.
- **Empaquetamiento.** Una vez lograda la completa homogeneización de la mezcla, la muestra puede ser empaquetada dentro de una columna vacía, que normalmente se trata de una jeringa o cartucho en cuya parte inferior se puede situar una frita de acero inoxidable o de PP, un filtro de celulosa o un tapón de lana de vidrio (usados en aplicaciones donde eran necesarios grandes cantidades de muestra). Se sitúa una segunda frita en la parte superior de la muestra y se comprime todo con ayuda de un émbolo de jeringa, teniendo en cuenta que se debe evitar la formación de canales preferentes en el columna y una compresión en exceso. La principal diferencia entre MSPD y SPE es que la muestra se dispersa por toda la columna y no se retiene solamente en unos pocos milímetros.

- **Limpieza.** Al igual que en las otras técnicas de extracción es necesaria una etapa de limpieza para evitar la introducción de muestras con alto contenido lipídico (que pueden perjudicar al sistema) en los equipos de separación y detección. La limpieza puede llevarse a cabo de dos modos, por un lado mediante una etapa adicional en donde se suele acoplar *on line* la columna de MSPD a un cartucho de SPE; sin embargo, proporciona la posibilidad de realizar la limpieza simultáneamente a la extracción de los compuestos, situando un adsorbente en la parte inferior (debajo de la mezcla homogénea muestra:sopORTE sólido) de la columna MSPD, reteniendo de este modo los compuestos interferentes de la matriz y realizando en un único paso la extracción y la limpieza [683].
- **Elución.** Como última etapa se lleva a cabo la elución de los analitos, pudiendo realizarse de dos modos diferentes: por un lado los analitos de interés permanecen retenidos en la columna mientras los compuestos interferentes son eluidos en un paso de lavado, realizando una elución posterior de los analitos con un disolvente diferente; y por otro lado, los interferentes de la matriz son retenidos de forma selectiva en la columna, mientras los analitos de interés son eluidos directamente. La mayor parte de las eluciones se realizan por gravedad, sin embargo, es posible aplicar algún tipo de presión (negativa o positiva) o mediante la utilización controlada de un sistema a vacío.



Figura II.10. Etapas típicas de montaje de la técnica MSPD.

Parámetros a considerar

La MSPD es, junto con la SPE, una forma de cromatografía y por tanto se aplican los mismos principios fundamentales. Sin embargo, la MSPD (a diferencia de SPE) es opuesta a todas las demás técnicas cromatográficas, designada para disgregar y dispersar los componentes de las muestras sólidas en una fase orgánica con un soporte sólido, que puede ser usado como el material de empaquetamiento de una columna por la cual los componentes de la muestra pueden ser eluidos. De este modo, la muestra empieza a ser dispersada a través de la columna y es parte de las características cromatográficas del sistema: las interacciones implicadas en la fase estacionaria, el soporte sólido, la fase móvil o de elución y también todos los componentes de la matriz de la muestra. Este tipo de interacción se observa en algunos métodos de SPE, donde los componentes de la muestra se acumulan en la cabeza de la columna y actúan como fase discontinua, que puede afectar a los resultados y a las recuperaciones. La acumulación de estos materiales está normalmente indicada por la presencia de picos con cola, picos divididos, hombros y, en algunas ocasiones, la pérdida completa de componentes de la muestra para el análisis. Con MSPD se dispersa la muestra por toda la fase de la columna creando una única fase cromatográfica.

Las interacciones dinámicas que son desarrolladas no son completamente entendidas. Sin embargo, podemos distinguir los factores que han sido estudiados para mejorar la resolución. Para la mayoría, estos son los mismos factores que se conocen como influyentes para la resolución del procedimiento SPE:

- **Naturaleza del dispersante.** La mayor parte de las aplicaciones de MSPD utilizan materiales en fase reversa, particularmente C_{18} y C_8 . Hay algunos estudios sobre el uso del cianopropil (CNPr) y materiales en fase normal. Para aislar analitos más polares se han utilizado adsorbentes de fase normal como sílices enlazadas a grupos polares (ej. aminas) u óxidos inorgánicos no enlazados (la propia sílice, alúmina, Florisil). Estos últimos interaccionan con los componentes de la matriz solamente por adsorción y, en consecuencia no producen su disolución; no obstante, sus propiedades absorbentes pueden modificarse dependiendo de su contenido en agua y de su carácter ácido o básico [682,684]. Se emplearon también materiales inertes (arena, tierra de diatomeas, Celite) reduciendo de este modo el coste global a expensas de una selectividad limitada, puesto que sólo está controlada por la solubilidad de los diferentes componentes de la muestra en el disolvente de elución. En algunos trabajos, aunque menos frecuentes, se utilizan algunos materiales menos comunes como el carbón grafitizado, adsorbentes poliméricos (XAD-7, Oasis® HLB), MIPs o nanotubos de carbono [684,685].

- **Naturaleza del material adsorbente empleado en la limpieza.** Aunque no es un parámetro que afecta en sí mismo a la extracción de los analitos a partir de la matriz, sí se considera importante al incorporarse en el cartucho de MSPD. Como se comentó anteriormente la función de este adsorbente es retener las interferencias permitiendo el paso de los analitos, por lo que su naturaleza dependerá de las propiedades de ambos: los materiales de fase normal como alúmina, sílice o Florisil, se utilizan normalmente para retener las interferencias polares en muestras dispersadas con C₁₈ u otros adsorbentes de fase reversa; para analitos con una elevada estabilidad química puede emplearse sílice acidificada (con niveles de hasta un 44 % de ácido sulfúrico), que destruye los lípidos y proporciona extractos extraordinariamente limpios con matrices grasas. No obstante, los inconvenientes que presenta este último material residen en el riesgo de retención de los analitos en la capa de carbón originada por la oxidación de la muestra y la restricción que conlleva para seleccionar el disolvente de elución, puesto que debe ser uno que no reaccione con el H₂SO₄, es decir, limitando la elección a disolventes de polaridad baja o media como alcanos, diclorometano o cloroformo [682,684].
- **Naturaleza de la matriz de la muestra.** Desde el momento en que la matriz de la muestra comienza a ser parte de la fase cromatográfica, esto anticipa que los resultados y la recuperación cambiarán para un analito dado con el cambio de una matriz a otra, como por ejemplo de tejido de peces a tomates. No obstante, existe poca información que establezca que es un hecho.
- **Modificaciones de la matriz.** Del mismo modo que las muestras líquidas se aplican a las columnas SPE, a veces es necesario modificar el estado de ionización de los componentes de la muestra para asegurarse que ciertas interacciones suceden entre la fase adherida del soporte sólido y/o el disolvente de elución en MSPD. Esto puede hacerse mediante la adición de ácidos, bases, sales, agentes quelatantes o no quelatantes, antioxidantes, etc.
- **Naturaleza del disolvente de elución y la secuencia de adición.** Como con la SPE, la polaridad relativa del disolvente de elución juega un papel muy significativo para determinar qué permanece en la columna y qué se eluye. En MSPD también se debe considerar la retención y la elución de los componentes de la matriz de la muestra. Como se comentó anteriormente, se observa que muchos analitos investigados se eluyen con componentes de la matriz bajo unas condiciones de polaridad que no se predicen fácilmente. No obstante, la secuencia y el diseño de un perfil de elución debería forzar todo lo posible la retención de la matriz de la columna, mientras que se

mueven los analitos investigados con un alto grado de especificidad. Esto no siempre se alcanza y debe aplicarse el uso de co-columnas y otras técnicas de limpieza. Sin embargo, para otras aplicaciones, la elución puede ser suficientemente limpia para llevarnos directamente a un análisis final. Para la extracción de analitos apolares los disolventes más recurrentes han sido el hexano, el diclorometano o la mezcla de ambos y para compuestos de polaridad media o alta otros como acetonitrilo, acetona, acetato de etilo o metanol [685].

Ventajas e inconvenientes

La extracción Soxhlet, PLE y MAE cuentan con el uso de condiciones muy drásticas para asegurar las recuperaciones cuantitativas a expensas de unos bajos niveles de selectividad. Por la contra, la MSPD posee unas características únicas como técnica de preparación de muestra. El uso de condiciones suaves de extracción (temperatura ambiente y presión atmosférica), junto con la adecuada combinación con el dispersante y una buena elución, proporcionan recuperaciones aceptables y una selectividad intermedia [684]. La MSPD proporciona una serie de ventajas frente a otras técnicas de extracción, como son: bajo precio por extracción, no existe la necesidad de emplear instrumentación de coste elevado, reducción del consumo de disolventes orgánicos, reducción de la manipulación y la cantidad de muestra, reducción del tiempo total del análisis e integración de la etapa de limpieza con la extracción. Por estas razones, la MSPD se considera una buena alternativa a otros métodos de extracción. Además, en ciertas ocasiones, la MSPD ha sido utilizada en combinación con PLE, puesto que el uso de disolventes a elevadas presiones y temperaturas pueden incrementar las recuperaciones de los analitos cuando estos permanecen muy ligados a la matriz sólida [238]. Sin embargo, su principal desventaja radica su dificultad para automatizar y la necesidad de la presencia del analista, como mínimo, durante las etapas de dispersión y empaquetamiento.

Aplicaciones de MSPD en matrices medioambientales

Esta técnica ha sido optimizada en la presente Tesis Doctoral para extraer parabenos, sus derivados clorados, PFASs y FRs (PBDE junto con NFRs) a partir de muestras de biota, mediante el desarrollo de tres procedimientos diferentes específicos para las características cada una de las familias.

A. *Parabenes*

Se han desarrollado varios métodos para la determinación de parabenes a partir de distintos tipos de matrices como lodos [686-688], suelos [654,688], sedimentos [687], cosméticos [689,690], plantas [691] e incluso a partir de muestras de tejidos de placenta [692,693]. No obstante, las extracciones a partir de muestras de biota no han sido muy estudiadas. Hasta el desarrollo del procedimiento en la presente Tesis Doctoral no existía ningún método de MSPD para la determinación de parabenes ni de sus derivados clorados a partir de este tipo de matrices.

Un estudio previo realizado por grupo de Canosa et al., desarrolla un procedimiento para la extracción de cuatro parabenes (MeP, EtP, PrP y BuP) a partir de muestras de polvo. En este caso se mezcló la muestra con el sulfato sódico anhidro, dispersándola posteriormente con 1,25 g de C₁₈. En la parte inferior del cartucho situaron 2 g de Florisil como material adsorbente para evitar la coelución de interferencias polares. Las interferencias apolares se eliminaron mediante un lavado con 10 mL de diclorometano, eluyendo posteriormente los analitos con 10 mL de acetonitrilo. Las recuperaciones obtenidas han sido superiores al 80 % para todos los compuestos, presentando LOQs entre 0,6 y 2,6 ng g⁻¹ [22].

El estudio más reciente donde se desarrolla un método de MSPD para la extracción de estos compuestos se realizó con muestras de tejidos de placenta (0,25 g), empleando para ello 0,75 g de sílice como agente dispersante y 0,75 g de una sílice enlazada a una amina primaria-secundaria (PSA) como material adsorbente, realizando la elución de los analitos (MeP, EtP, PrP, PrP y seis disruptores endocrinos más) con 12,5 mL de metanol. Las recuperaciones obtenidas de los cuatro parabenes son superiores al 96 % y los LODs de 0,1 ng g⁻¹ [692].

B. *Ácidos perfluoroalquilados*

La aplicación de MSPD a la extracción de estos analitos es realmente escasa [433,694], de hecho, el método desarrollado en la presente memoria no sólo ha sido el primero con aplicación a muestras de biota, sino también a cualquier tipo de matriz.

No es hasta el año 2014 cuando García-Valcarcel et al. [694] desarrollaron un procedimiento de MSPD para la determinación de seis PFASs, tres PFCAs (C4, C8, C10) y tres PFASs (C4, C6, C8), en plantas. La mezcla homogeneizada constituida por la dispersión de 0,5 g de muestra con 1,5 g de Florisil (lavado previamente con acetonitrilo:metanol (50:50)),

se sitúa en una jeringa vacía de PP atrapada entre dos filtros de celulosa, y se realiza la elución de los analitos con 7 mL de acetonitrilo:metanol (50:50). Se emplea en una etapa posterior 30 mg de carbón grafitizado como material adsorbente para realizar la limpieza del extracto. Para ello se introduce una alícuota del 1 mL de eluato junto con ese material adsorbente en el interior de un tubo, agitando la mezcla en el vórtex durante 1 min y centrifugando a 4.000 rpm durante 10 min. El eluato final se pasó a través de unos filtros de jeringa de 0,22 μm (PP) antes de su inyección en el sistema LC-MS/MS. Las recuperaciones de los tres analitos de interés en la presente memoria (PFOA, PFDA y PFOS) oscilaron entre un 70 y un 100 %, obteniéndose LODs inferiores a 2 ng g^{-1} .

C. Retardantes de llama

Entre las tres familias de compuestos estudiados en la presente Tesis Doctoral, los FRs han sido los determinados mediante MSPD en un mayor número de ocasiones. Las muestras han sido muy variadas, analizando su presencia en plantas [691] u hortalizas [695], polvo [433], suelos [695], lodos [696] e incluso en tejidos de placenta humana [697,698]. A diferencia de las dos familias anteriores, se desarrollaron varios métodos para evaluar la presencia de algunos PBDEs (normalmente los más ligeros) en muestras de biota [488,699-701]; sin embargo, no se había desarrollado ningún procedimiento para la determinación de ningún NFR en este tipo de matriz hasta el presentado en uno de los capítulos de la presente memoria.

Carro et al. [488] desarrollaron el primer método de MSPD para la extracción simultánea de PBDEs (BDE-47, 99 y 100), PCBs y PBBs a partir de muestras de rodaballo y moluscos. En este caso 1,5 g de muestra se dispersan en 1 g C_{18} , situando la mezcla homogeneizada en la capa superior de un cartucho, compuesto por una primera capa de 2 g de sílice acidificada (40 % peso/peso (w/w) H_2SO_4) y una segunda de 1,5 g de alúmina básica. Se adicionaron 30 mL de hexano para lograr la elución de los analitos, concentrando el eluato a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y disolviendo posteriormente el extracto en 200 μL hexano para la inyección en el sistema GC-MS/MS. Se obtuvieron recuperaciones superiores al 100 % para la mayor parte de los compuestos polihalogenados, sin embargo, el Material de Referencia Certificado (CRM) (IAEA 406) empleado para la evaluación de la exactitud del método no certificaba ninguno de los PBDEs del estudio. Los LODs obtenidos para los tres PBDEs oscilaron entre 0,3 y 0,9 ng g^{-1} .

En un estudio más actual se desarrolla un procedimiento de MSPD para lograr la extracción a partir de muestras de moluscos de numerosas especies de escasa polaridad:

PAHs, PCBs, OCPs, pesticidas organofosforados (OPPs) y PBDEs (BDE-28, 47, 66, 85, 99, 100, 153 y 154). En este caso, se dispersan 0,3 g de muestra con 0,3 g de Florisil, emplazando la muestra en una jeringa de vidrio (descartaron las de plástico por presentar interferencias de varios hidrocarburos y generar cromatogramas más sucios) a continuación de 4 g de sílice activada (adsorbente de limpieza). Todos los analitos se eluyeron con 25 mL de diclorometano, llevando los extractos a sequedad y reconstituyéndolos con 140 μL de hexano para su inyección en el sistema GC-MS/MS. Las recuperaciones obtenidas para los PBDEs a partir de muestras de mejillones oscilaron entre 64 y 93 %, y frente a un CRM (SRM-2977) entre 84 y 109 % (excepto PBDEs 153 y 154 que no se encontraban certificados en el material). Se obtuvieron LODs de los PBDEs comprendidos entre 0,24 y 8,1 ng g^{-1} dw [701].



3. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

Entre las diferentes técnicas de determinación existentes, la cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) y la cromatografía de líquidos (*liquid chromatography*, LC), acopladas a MS o MS/MS han sido las más utilizadas hasta la fecha para lograr la determinación de los diferentes contaminantes estudiados (PCPs, PFASs y FRs) a partir de diferentes matrices medioambientales. Aunque en menor medida, cabe destacar el empleo de otros sistemas de detección como el ECD, en el caso de la GC, o de los detectores de absorbancia UV-VIS con LC.

En la presente Tesis Doctoral se han empleado tanto GC como LC para la separación de los analitos de interés, empleando diferentes detectores en función de la familia a analizar: PCPs mediante GC-MS/MS y LC-MS/MS, PFASs por LC-MS/MS y los FRs mediante GC-MS.

A continuación, se recoge una breve introducción teórica seguida de una revisión bibliográfica de la aplicación de las diferentes técnicas en la determinación de los contaminantes estudiados.

3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Conocida también como cromatografía gas-líquido, la GC está basada en la distribución de los analitos entre una fase móvil gaseosa (gas portador) y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido (columna cromatográfica); donde a diferencia de otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, teniendo como única función el transporte de los analitos a través de la columna. Se trata del método de elección para la separación de sustancias volátiles y semivolátiles térmicamente estables en base principalmente a la distinta volatilidad de los analitos presentes en una mezcla. Su campo de aplicación involucra un enorme número de sustancias orgánicas y organometálicas así como gases permanentes, lo cual convierte a la técnica en una de las más versátiles y potentes del laboratorio analítico. Ninguna otra técnica de separación es capaz de proporcionar una resolución equivalente y a la vez una sensibilidad tan elevada. Su principal limitación está en la estabilidad de los componentes de la mezcla o de la propia matriz.

3.1.1 Derivatización

La derivatización surge como un intento de ampliar el campo de aplicación de la GC a sustancias no volátiles, polares o mal adaptadas a la técnica. Las reacciones de derivatización tienen dos objetivos principales [508]:

- ✓ hacer posible la utilización de la técnica mejorando la estabilidad térmica de los analitos y la resolución cromatográfica, evitando la formación de picos indeseables y las adsorciones irreversibles, o cambiando las propiedades separativas del analito mediante un ajuste de su volatilidad. Esta es la finalidad de emplear la derivatización en nuestro estudio de PCPs.
- ✓ modificar indirectamente la sensibilidad del detector, introduciendo en la molécula del soluto grupos orgánicos adecuados que mejoran la sensibilidad del mismo y su poder de discriminación. Así se facilita el análisis cualitativo y cuantitativo.

Estas modificaciones se realizan generalmente en sistemas pre-columna y de forma discontinua (*off line*), de modo que la transformación se lleva a cabo antes del análisis mediante GC. Existen distintos tipos de reacciones de derivatización que han sido aplicadas al análisis de compuestos con características similares a los que son objeto de estudio (compuestos fenólicos) [702-704]:

- **Sililación.** Consiste en la sustitución de un hidrógeno activo de un grupo funcional (-OH, -COOH, -NH, -SH, etc.) por un grupo sililo (átomo de silicio trisustituído) a través de una sustitución nucleófila, mediante la formación de un enlace Si-O, Si-N, Si-S, etc. La sustitución del hidrógeno aporta la reducción de la polaridad del compuesto sililado, la reducción de la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, y un aumento de la volatilidad y estabilidad térmica. Para llevar a cabo este tipo de reacciones es necesario un medio aprótico (puesto que la presencia de protones en el disolvente podría consumir el derivatizante) y puede ser necesario elevar la temperatura o, en los casos más afortunados, es suficiente la temperatura ambiente [703]. En algunos casos, se requiere la presencia de un catalizador (ej. 1 % de trimetilclorosilano, TMCS) para mejorar la reactividad de ciertos grupos funcionales (como anillos secundarios). Los espectros de masas en impacto electrónico para los derivados sililados se caracterizan por presentar una débil presencia del ión molecular. Los derivados del trimetilsilano (TMS) experimentan típicamente pérdidas de $m/z=15$ correspondientes al desplazamiento de los grupos metilo por lo que, de forma general, uno de los fragmentos más abundantes es el $[M-15]^+$, mientras que para los derivados del *tert*-butildimetilsilano (TBDMS) se corresponde con el fragmento $[M-57]^+$ (pérdida

de un grupo *tert*-butilo). Algunos de estos agentes derivatizantes empleados con más frecuencia, cuyas estructuras aparecen recogidas en la Figura II.11, son: BSA, *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), *N,O*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) o MTBSTFA. En la Figura II.12 se muestra la reacción de derivatización que tiene lugar entre los derivados de grupos fenólicos (parabenes y triclosán) y el MTBSTFA (empleado en la presente Tesis).

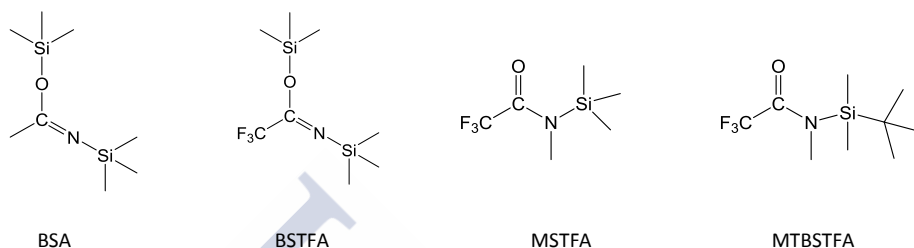


Figura II.11. Estructuras de los derivatizantes de sililación más empleados.

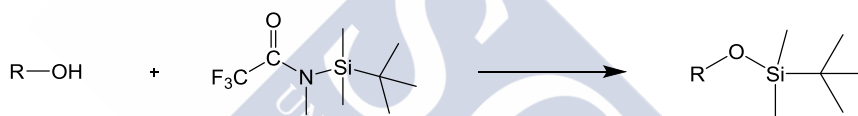


Figura II.12. Reacción de derivatización entre derivados fenólicos y MTBSTFA.

- **Alquilación.** Consiste en la sustitución de un hidrógeno activo de un grupo funcional ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$, etc.) por un grupo alquilo, originando la formación de ésteres, éteres o amidas. En general los ésteres de alquilo formados presentan una gran estabilidad pudiendo ser aislados y almacenados durante largos períodos. Estas reacciones de esterificación suelen estar catalizadas por un ácido inorgánico, como el ácido clorhídrico o el cloruro de tionilo. Entre los agentes más empleados en este tipo de derivatización están los dialquilacetales, diazoalcanos, bromuro de pentafluorobencilo (PFBB r), bencilbromuro, trifluoruro de boro en metanol o butanol e hidróxido de tetrabutilamonio (TBH). En la Figura II.13 se representa la reacción entre los derivados de grupos fenólicos y grupos alquilo compuestos por una cadena hidrocarbonada unida a un halógeno X.



Figura II.13. Reacción de derivatización entre derivados fenólicos y agentes alquilantes.

- **Acilación.** Tiene lugar la sustitución de un hidrógeno activo (-OH, -COOH, -NH, -SH, etc.) de un grupo funcional por un grupo acilo, originando los correspondientes ésteres, amidas y tioésteres. Los derivados acilados suelen generar fragmentos en el espectrómetro de masas fáciles de interpretar, que proporcionan información muy útil sobre la estructura de los analitos. Estas reacciones pueden llevarse a cabo en un medio acuoso con altos rendimientos. Además, estos reactivos son económicamente más asequibles que los sililantes y generan mayor estabilidad en los derivados formados. Entre los reactivos más comunes se encuentran la acilación con anhídridos de ácidos, las reacciones con haluros de acilo y otros acilderivados como los alclloroformatos, acilimidazoles y acilamidas.

El anhídrido acético y los cloroformatos, ambos evaluados para la derivatización de parabenos y triclosán en la presente memoria, suelen ser los reactivos más habituales en este tipo de reacciones. El anhídrido acético conlleva la necesidad de emplear medios básicos (presencia de hidrógenofosfatos, hidrógenocarbonatos, piridina o hidróxido sódico) para neutralizar el exceso y los productos ácidos formados. Es necesario estudiar el tipo de base a emplear, porque en algunos casos los productos secundarios pueden generar problemas en la columna del equipo, siendo por tanto necesaria una eliminación previa [705]. Por otro lado, el uso de cloroformatos surge como alternativa a la utilización de anhídrido acético, puesto que se trata también de una reacción rápida, compatible con GC y de alto rendimiento. Estos últimos necesitan un medio alcalino (piridina o hidrogenofosfato) y ser disueltos previamente en un disolvente miscible con el agua (acetona, acetonitrilo o alcohol) debido a su baja solubilidad en un medio acuoso, donde la hidrofobicidad aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada (butilo > propilo > etilo). En la Figura II.14 se representa la reacción que tiene lugar entre compuestos fenólicos y agentes acilantes.



Figura II.14. Reacción de derivatización entre derivados fenólicos y agentes acilantes.

3.1.2 Sistemas de inyección

En la mayor parte de los casos, los sistemas de inyección de una muestra líquida en GC son del tipo vaporizador, donde la volatilización de la muestra se logra mediante un incremento de temperatura, a excepción de los sistemas de inyección fría en columna en los que la muestra es introducida directamente en cabeza de columna. En ambos tipos de sistemas de inyección se requiere el uso de *liners*, dispositivos empleados como cámara de calentamiento para facilitar el proceso de evaporación de la muestra manteniéndose a temperaturas comprendidas entre 250 y 350 °C (sistemas de vaporización), o como sistema de guía de la aguja para la introducción directa de la muestra en la columna cromatográfica (sistemas de inyección fría en columna); aunque en algunos casos los *liners* también pueden contener algún tipo de elemento destinado a retener las impurezas no volátiles o a concentrar los solutos de interés logrando bandas más estrechas.

Además del **inyector *split/splitless***, el **inyector de temperatura programada** (*programmed temperature vaporizer*, PTV), combina las ventajas de los portales de inyección con/sin división con los del inyector en columna (a continuación). En este caso, la inyección se realiza manteniendo el *liner* a una temperatura ligeramente inferior a la de ebullición del disolvente en modo *split*, originando la eliminación del disolvente por medio de la línea de división mientras que los analitos menos volátiles permanecen en el *liner*. A continuación, se pone la válvula en posición *splitless* introduciéndose los analitos en la columna tras un incremento de la temperatura del inyector. Este modo de inyección ha sido empleado en uno de los tres trabajos de la presente memoria realizados en GC, más exactamente para la determinación de parabenes y triclosán en muestras de aguas.

Existen diferentes formatos de *liners* (rectos, rectos con muesca o configuración en zig-zag) que contienen diversos materiales en su interior (Tenax, lana de vidrio, poliimida, etc.). Tanto su forma como su diseño deben ser seleccionados en función del tipo de inyectores empleados, aunque de modo general el objetivo de la selección del *liner* es incrementar la retención de los analitos durante la eliminación del disolvente minimizando así la pérdida de los mismos [508].

3.1.3 Sistemas de detección: acoplamiento a espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una poderosa herramienta para la identificación de compuestos puros, pero es insuficiente para el análisis incluso de las muestras más simples, ya que la identificación está limitada por el inmenso número de fragmentos de diferentes valores *masa/carga* (m/z) producidos. Así fue cómo a partir de la

década de los 70, la GC-MS se ha convertido en una de las más poderosas técnicas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas dada su elevada sensibilidad y selectividad. Para la mayor parte de los compuestos la MS es una técnica de detección más sensible y específica que otros detectores de GC, aunque en ocasiones se utiliza para complementar la información de estos últimos.

Los principales componentes de un sistema GC-MS son el *cromatógrafo de gases*, la *interfase*, la *fuelle de ionización* (donde las moléculas neutras se transforman en iones que son acelerados y focalizados, y que adicionalmente podrían experimentar algún tipo de fragmentación), el *analizador* (que separa los iones en función de su relación m/z) y el *sistema de detección*. Se necesitan también una o varias bombas de vacío capaces de proporcionar las condiciones de alto vacío que se requieren en el espectrómetro y un sistema de control y adquisición de datos. El sistema de introducción de la muestra (interfase) procedente del GC en el MS es directo, ya que el caudal de las columnas capilares es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización.

Entre las diferentes fuentes de ionización existentes para fase gas, la fuente de impacto electrónico y la fuente de ionización química han sido las más empleadas hasta la fecha. A continuación se recogen las características de cada proceso [706]:

- **Impacto electrónico (electronic impact, EI).** Los electrones emitidos por un filamento caliente de renio o wolframio son acelerados mediante una diferencia de potencial de 70 eV (generalmente), haciéndolos incidir perpendicularmente contra las moléculas de interés, originando la formación de un ión molecular de carga positiva ($M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$) y algo de energía adicional. La energía adicional induce la fragmentación (vía vibraciones, rotaciones y reorganización molecular) en todos los iones positivos posibles. Por otro lado, la baja presión evita la colisión de las moléculas y los iones formados lo que permite su separación, originando espectros de masas muy característicos de cada molécula. Se trata de un método agresivo (fuente de ionización dura), a veces sin ión molecular, donde el pico base aparece a una masa menor que la de M^+ . Esta fuente ha sido la empleada en la presente memoria para la determinación de parabenos y triclosán a partir de muestras de agua (GC-(EI)-MS).
- **Ionización química (chemical ionization, CI).** En este caso las moléculas gaseosas de la muestra son ionizadas por colisión con iones reactivos producidos por el bombardeo de electrones de un gas reactivo en exceso. La medición de los iones positivos o negativos generados tras la ionización de la muestra permite dos posibles modos de trabajo, la ionización química positiva (PCI, medición de iones positivos) y la ionización

química negativa (NCI, medición de iones negativos). La PCI suele utilizarse en aquellos casos donde el espectro de masas obtenido mediante EI proporciona numerosos fragmentos con relación m/z muy baja (arroja escasa información). Los iones reactivos actúan generalmente como ácidos de Brönsted (BH^+) capaces de reaccionar con aquellas moléculas de la muestra que tienen alta afinidad protónica, produciendo iones moleculares o cuasimoleculares. El éxito de este modo de trabajo reside principalmente en el tipo de gas reactivo seleccionado (normalmente metano, *iso*-butano o amoníaco) y en la naturaleza de las posibles interferencias. Las principales reacciones del metano (gas más comúnmente empleado en CI) con los electrones y las correspondientes reacciones con la molécula se muestran recogidas a continuación:

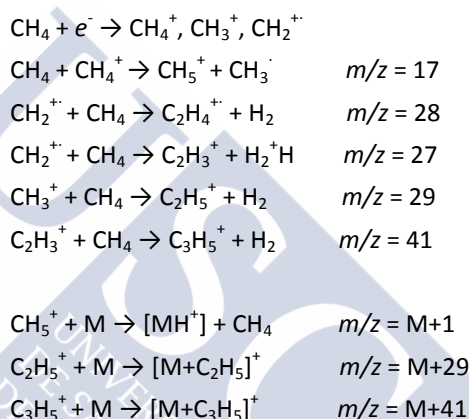


Figura II.15. Reacciones del metano con los electrones y con las correspondientes moléculas.

En el caso de NCI, su importancia reside en la selectividad que ofrece para la detección de analitos a bajas concentraciones (partes por trillón (ppt)), además de suprimir la aparición de las típicas interferencias producidas por la matriz de la muestra generando altos valores de relación señal/ruido (S/N). La NCI es de gran utilidad para la determinación de analitos con elevados valores de afinidad electrónica (presencia de átomos muy electronegativos) ya que originan aniones moleculares estables (M^-) y espectros muy sencillos o fácilmente interpretables. En este caso el término CI no se considera muy correcto, ya que habitualmente la reacción principal tiene lugar por la captura de electrones de baja energía (2 eV, generados por la colisión del gas de reacción con los electrones emitidos por el filamento) por parte del analito; por tanto no existen reacciones moleculares iónicas en el proceso inicial de formación de iones. Normalmente, los analitos que proporcionan buenos resultados con ECD suelen presentar un buen comportamiento con NCI. De forma general, los analitos detectados empleando NCI suelen contener en su estructura halógenos, grupos nitro,

dobles enlaces y/o estructuras conjugadas, y/o heteroátomos. Entre los gases de reacción empleados se encuentran el metano, amoníaco y dióxido de carbono. Es necesario evitar la presencia de agua y oxígeno, puesto que tienden a captar electrones y podrían generar la supresión de la señal. Entre uno de los factores importantes que puede afectar a la sensibilidad de NCI es la temperatura de la cámara de ionización, siendo las temperaturas más bajas (no menos de 150 °C) las que favorecen el proceso de captación de electrones. A continuación, se recoge el procedimiento de reacción en NCI:

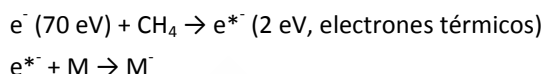


Figura II.16. Reacciones en NCI.

Por tanto, la CI se trata de un método de ionización suave y se obtienen espectros de masas más sencillos (escasez de fragmentos, destacando por lo general la presencia del ión cuasimolecular). En la presente memoria, la NCI ha sido empleada para la determinación de los FRs mediante GC-MS, debido a presencia de átomos de bromo o cloro en su estructura.

Una vez generados, los iones formados en la fuente son conducidos al analizador donde, tal y como se ha dicho anteriormente, se separarán según su relación m/z dentro del rango de masas seleccionado. El analizador ideal debería ser capaz de distinguir masas muy pequeñas y, simultáneamente, permitir el paso de un número suficiente de iones para producir corrientes iónicas fáciles de medir. Para efectuar la separación en función de su relación m/z se pueden utilizar distintos dispositivos [707], entre ellos analizadores de sector magnético (B), analizadores de tiempo de vuelo (ToF), analizadores de masas cuadrupolar (Q) o trampas de iones (IT). A continuación, se recoge una explicación más detallada de aquellos empleados en la presente Tesis:

- **Analizador de masas cuadrupolar (Q).** Consiste en dos pares de rodillos de sección hiperbólica dispuestos longitudinalmente a lo largo de un mismo eje que actúan como electrodos. A cada uno de estos pares se le aplica una combinación de potenciales de radiofrecuencia (RF) y de corriente continua (DC) que se van variando de forma tal que sólo los iones con una cierta relación m/z consiguen atravesar completamente el filtro de masas, el resto de iones inciden sobre las barras y se convierten en moléculas neutras. Los cuadrupolos tienen distintos modos de transmisión de iones:

- **Modo SCAN (o de barrido):** los potenciales se varían linealmente manteniendo constante la relación RF/DC; el resultado es la filtración continua de los iones con m/z crecientes, dando lugar al espectro de masas de la molécula de partida. Se emplea cuando se realizan análisis cualitativos ya que no se pierde información de ningún fragmento de masas, lo que genera una menor sensibilidad frente al modo SIM y evita su utilización para cuantificación.
- **Modo SIM (*selected ion monitoring*):** los potenciales de RF y DC se mantienen constantes y sólo los iones con un valor específico de m/z pueden atravesar el analizador; el resto de iones chocan con los rodillos y no llegan al detector. Este modo de funcionamiento es el más sensible y se selecciona para cuantificación.

Los analizadores cuadrupolares convencionales resuelven fácilmente iones que difieren en una unidad de m/z , llegando hasta 3.000 o 4.000 m/z . Presentan además una velocidad de barrido elevada que permite generar el espectro de masas en menos de 100 ms. Este tipo de analizador es el que se emplea en la presente memoria para la determinación de los FRs (GC-(NCI)-MS(Q)).

- **Analizador de trampa de iones (IT).** La trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos o magnéticos. La IT consta de un electrodo anular y un par de electrodos colectores que forman una cavidad. Los electrodos colectores están conectados con tierra, mientras que el electrodo anular está sometido a un potencial de RF variable que crea un campo eléctrico hiperbólico tridimensional en el que los iones con un valor apropiado de m/z son atrapados en órbitas estables dentro de la cavidad. El incremento del potencial de RF origina la desestabilización de las órbitas de los iones más ligeros y son expulsados hacia el detector. La versión comercial permite resolver iones que difieren en una unidad de m/z con un intervalo de trabajo habitual de entre 10 y 650 m/z . Estos analizadores son fácilmente configurables para trabajar en MS/MS, pero su desventaja reside en que no permite la selección de iones discontinuos como los Q en modo SIM. Este tipo de analizador es el que se emplea en la presente memoria para la determinación de parabenos y triclosán en aguas.

Una variante importante de MS es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), que en combinación con GC (GC-MS/MS) permite obtener LODs muy bajos debido a su elevada especificidad. La técnica de MS/MS puede ser llevada a cabo de dos modos diferentes, en el espacio o en el tiempo.

En el caso de la IT, se efectúa MS/MS en el tiempo, puesto que una vez que se han estabilizado los iones producidos mediante EI o CI, se aísla un ión precursor, expulsando al resto de la trampa. A continuación, se procede a la fragmentación de dicho ión precursor por colisión con moléculas de He y finalmente se analizan los iones producto mediante un barrido del potencial de RF. En el caso de MS/MS en el espacio, es necesario el posicionamiento en serie de tres analizadores, debido a que el proceso global se efectúa en diferentes partes del sistema, siendo el sistema triple-cuadrupolo (QqQ) el más común de este tipo. En el primer cuadrupolo tiene lugar el primer filtro de masas para la selección del ión precursor, en el segundo cuadrupolo (actualmente celda de colisión) tiene lugar el proceso de colisión de dicho ión precursor con un gas inerte (por lo general Argón o Nitrógeno) para dar lugar a los iones producto que son analizados en el último cuadrupolo. Los QqQ permiten operar en cuatro modos de trabajo según sea la combinación de los modos de transmisión en los dos cuadrupolos exteriores:

- *Product Ion Scanning*: el primer analizador opera en modo SIM, seleccionando una relación m/z característica del analito; el tercero opera en modos SCAN generando el espectro de fragmentación del ión anterior.
- *Precursor Ion Scanning*: ocurre a la inversa del caso anterior, el primer cuadrupolo hace un barrido de iones precursores y el tercero sólo permite alcanzar el detector a aquellos fragmentos comunes con una determinada relación m/z .
- *Neutral Loss Scanning*: ambos cuadrupolos operan en modo SCAN.
- *Multiple Reaction Monitoring (MRM o SRM)*: ambos analizadores actúan en modo SIM. Este modo de trabajo es el más sensible y, por tanto, es empleado para un análisis cuantitativo.

En el caso de GC-MS/MS los sistemas que emplean IT presentan menor coste, siendo por tanto el seleccionado en la presente memoria para la determinación de parabenos y triclosán en las matrices medioambientales (GC-(EI)-MS/MS(IT)).

3.1.4 Aplicación de GC-MS a la determinación de los compuestos de interés en muestras ambientales.

A continuación, se presenta una revisión bibliográfica de la aplicación de la técnica GC-MS a cada una de las familias de contaminantes estudiadas en la presente Tesis Doctoral, recogiendo al final de cada una de ellas unas tablas a modo resumen de las diferentes condiciones empleadas en cada una de ellas.

Parabenes y triclosán

La GC ha sido ampliamente utilizada para lograr la separación de los PCPs estudiados en la presente memoria, a partir tanto de muestras acuosas (Tabla II.19) como de biota (Tabla II.20), siendo su acoplamiento con MS el sistema de detección por excelencia. Todos los analitos, incluso los derivados clorados, han sido determinados en más de una ocasión mediante esta técnica. Sin embargo, aunque en menor medida, también se han utilizado otros tipos de detectores basados en fenómenos de ionización, como el detector de ionización de llama (FID) [544,561,573,581] o ECD (en etapas iniciales de optimización) [174].

Los analitos de interés son fácilmente derivatizables lo que permite su inyección en el sistema de GC. En la mayor parte de los casos se han empleado agentes sililantes como BSTFA [127,150,157,562,708], MSTFA [144,200,639,709] o MTBSTFA [31,50,174], puesto que la reacción de los grupos fenoles con estos agentes tiene lugar de forma rápida y cuantitativa, originando productos de gran estabilidad [710]. No obstante, otros autores han preferido seleccionar otro tipo de agentes derivatizantes, como agentes alquilantes empleando diazometano [172,510] o diazoetano [72], o agentes acilantes empleando anhídrido acético [160] o anhídrido pentafluoropropiónico [49]. En algunos casos, como consecuencia del carácter ligeramente más apolar que presenta el triclosán frente a los parabenes, este ha sido determinado sin necesidad de derivatización [169,198,711].

En cuanto al modo de inyección y las columnas más frecuentemente utilizadas, estos son *splitless* y fases estacionarias de 5 % difenil 95 % polidimetilsiloxano de 30 m de longitud, diámetros internos de 0,25 o 0,32 mm y espesor de fase de 0,25 μ m [127,150,510,562]. La ionización de estos analitos suele realizarse mediante EI, aunque algunos autores como Agüera et al. [169] compararon la sensibilidad generada mediante EI frente a la proporcionada por NCI para la determinación del triclosán, obteniendo LODs cincuenta veces inferiores en el segundo caso. Entre los posibles analizadores de MS, IT y los Q y QqQ han sido los utilizados con mayor frecuencia.

Tabla II.19. Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de agua mediante GC-MS o GC-MS/MS.

Analitos	Matriz	Extracción	Derivatizante	Inyección	Columna	Detección	LOD o LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP (y filtros UV)	río, efl., infl., subterránea, potable	UA-DLLME	BSTFA	PTV-splitless	TG-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS (QqQ)	LODs: 8 - 230 LOQs: 20 - 770	[562]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP, TCS (+ 2 clorofenoles)	efl., infl., río, piscina	USAEME	Ac ₂ O (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs: 3,9 - 16,4	[160]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, <i>i</i> -BuP, <i>n</i> -BuP, BzP, ClMeP, Cl ₂ MeP (+ parabenos Cl)	río	SPE	BSTFA	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,32 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LOQs: 2,1 - 12	[150]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP, BzP	efl., infl.	SPME	MTBSTFA	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LOQs: 1 - 25	[50]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP, TCS (+ PCPs)	río	SPE	MSTFA	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,1 - 0,5	[144]
TCS (y varios EDs)	río, efl.	LD-SBSE	-	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 12 (efl.) 8 (río)	[711]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP, TCS (+ PCPs)	efl., infl.	SPE	PFPA	splitless	Rtx-5Sil MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 10	[49]
TCS (+ MeTCS)	grifo, río, efl., infl.	DLLME	MTBSTFA	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LOQs: 2 - 5	[174]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, <i>i</i> -BuP, <i>n</i> -BuP, BzP, ClMeP, Cl ₂ MeP (+ EDs)	grifo, pozo, estanque, piscina, río, residual	SPE	BSTFA	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,01 - 0,08 LOQs: 0,03 - 0,2	[127]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, <i>i</i> -BuP, <i>n</i> -BuP, TCS (+ antimicrobianos y filtros UV)	río	SPE	BSTFA	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(IT)	LOQs: 0,6 - 2,4	[157]

EDs: disruptores endocrinos, efl.: efluente, infl.: influente, PFPA: anhídrido pentafluoropropiónico.

Tabla II.20. Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de biota mediante GC-MS o GC-MS/MS.

Analitos	Matriz	Extracción	Derivatizante	Inyección	Columna	Detección	LOD o LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
MeP, EtP, PrP, BuP, TCS (+PPCPs)	almejas, peces	PLE	BSTFA	splitless	Rxi-5Sil (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LOQs: 1,1 - 2,1 dw	[708]
TCS (+ PPCPs)	peces	PLE	MSTFA	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs: 3,4 ww	[709]
TCS (+ PPCPs)	peces	UAE / SLE Sonicación	MSTFA	splitless	VF-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs: 38 lw	[639]
TCS (+ PPCPs)	peces	SLE agitación	MSTFA	splitless	VF-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs: 38 lw	[200]
TCS	sangre de delfines	SLE (MTBE)	diazometano	splitless	DB-5 MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,033 ww	[172]
TCS (+ MeTCS)	peces	MSPD	MTBSTFA	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LOQs: 1 dw	[31]
TCS	peces	SLE y LLE	-	splitless	MSDBE (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,01 ww	[198]
TCS (+ derivados)	peces	SLE agitación	diazometano	splitless	Ultra-2 (25 m x 0,32 mm; 0,52 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 2,5 ww	[510]
TCS (+ MeTCS)	peces	PLE	2,3,4,5,6- pentafluoroben cildromuro	splitless	VF-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LOQs: 0,20 ww	[199]

PPCPs: fármacos y productos de cuidado personal.

Ácidos perfluoroalquilados

A diferencia de las otras dos familias de contaminantes, la determinación de los PFASs mediante GC ha tenido escasa aplicación, surgiendo como alternativa a LC-MS para evitar la típica aparición de contaminación instrumental en blancos [712-715]. Destacan unas pocas investigaciones que se presentan recogidas en la Tabla II.21, destinadas a la determinación de PFCAs en matrices acuosas [295,301,307,312,528,712], sin embargo no es un método válido para PFSAs.

La utilización de GC implica la necesidad de derivatización de los analitos. El procedimiento más común para lograr la derivatización de estos analitos consiste en la formación de grupos metil éster (PFCAs-Me), aunque ello implica la utilización de columnas capilares apolares de gran espesor de fase (4,0 μm) e imposibilita la determinación de los PFCAs con menos de seis átomos de carbono en su estructura ya que no logran ser retenidos en la columna [712]. Una alternativa consiste en la formación de grupos butil éster (PFCAs-Bu), que permite la utilización de columnas de menor espesor (1,4 μm) permitiendo la determinación de estos compuestos de cadena corta [312]. La formación de los derivados butilados puede realizarse de varios modos, entre ellos mediante la reacción de alquilación simple entre un par iónico perfluorocarboxilado (obtenido tras la reacción entre los analitos y un agente formador de pares iónicos, normalmente una sal de TBA) y las temperaturas elevadas características del puerto de inyección del sistema GC [295,312]. En otros casos la derivatización de estos compuestos se puede lograr mediante la adición de agentes acilantes como el *i*BCF [307].

La muestra líquida se inyecta normalmente en modo *splitless* aunque el tipo de columna utilizada ha sido muy variado. Entre ellas destaca la columna capilar constituida por una fase estacionaria de mediana polaridad de 6 % cianopropilfenil 94 % dimetilpolisiloxano (ZB-624 y DB-624) [295,312]; sin embargo, se han utilizado otras con una fase estacionaria apolar como la SPB-1 o ZB-5 con un 100 % o un 95 % de dimetilpolisiloxano, respectivamente, o la Rtx-200 constituidas por una fase polar (35 % trifluoropropil 65 % dimetilpolisiloxano).

Entre los posibles modos de ionización de los analitos, NCI [295,307,312] y EI [528,712] han sido los más utilizados. Sin embargo, algunos autores como Alzaga et al. [312] realizaron un estudio comparativo entre los diferentes modos de ionización (EI, PCI y NCI) con la intención de evaluar los diferentes comportamientos y seleccionar aquel que proporcione mejores resultados en cuanto a sensibilidad y selectividad de los PFCAs-Bu. La falta de especificidad de los iones generados por EI ($m/z=57, 69, 119, 169, 219$) impide la realización de una determinación cualitativa o cuantitativa, es decir, presentan los mismos

Tabla II.21. Condiciones empleadas para la determinación de PFCAs en muestras de agua mediante GC-MS o GC-MS/MS.

Analitos	Matriz	Extracción	Derivatizante	Inyección	Columna	Detección	LOD o LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
C4-C12	efl., mar	SPME	butanol anhidro	splitless	ZB-624 (60m x 0,25 mm; 1,4 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 20 - 750 LOQs: 50 - 2.500	[312]
C5-C12	río	SPE	/BCF	splitless	Rtx-200 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,1 - 6 LOQs: 0,4 - 19	[307]
C6, C8-C10	río, mar	DLLME	ITBA	splitless	BD-624 (30 m x 0,25 mm; 1,4 µm)	(NCI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 37 - 51 LOQs: 123 - 170	[295]
C8 y C12	subterránea	SPE	metil yoduro	splitless	SPB-1 (30 m x 0,32 mm; 4,00 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 18.000 LOQs: 36.000	[712]
C2-C9	lluvia	SPE	2,4- difluoroanilina N,N- diciclohexilcarb odilimida	splitless	ZB-5 (30 m x 0,25 mm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,01	[528]

ITBA: yoduro de tetrabutilamonio, efl.: efluente.

iones que los correspondientes PFCAs-Me [712]; y aquellos iones específicos que contienen átomos de flúor en su estructura corresponden únicamente al 10 - 15 % de la abundancia total, lo que conlleva a un empeoramiento de los LODs. Por otro lado, la sensibilidad obtenida con PCI, ya sea con amoníaco o metano, es hasta cinco veces inferior que la proporcionada con NCI. Finalmente, selecciona NCI con amoníaco como gas de reacción tras obtener sensibilidades tres veces superior a la generada con metano. Estos resultados, en cuanto a la selección del gas de reacción, coinciden con los obtenidos por Chaler et al. [716], donde la sensibilidad obtenida empleando amoníaco es entre cinco y diez veces superior a la generada con el metano para compuestos orgánicos halogenados. GC-NCI-MS demuestra ser una buena alternativa para lograr la determinación de PFCAs frente a HPLC-MS/MS, tras obtenerse de la mano de Dufková et al. [307] LODs del orden de ppt (ng L⁻¹).

Hasta la fecha, a diferencia de los parabenos, el tipo de analizador empleado para la detección de los PFAAs a partir de muestras de agua o biota ha sido Q [307,312,528,712] y QqQ [295].

Retardantes de llama

En este caso, al contrario de las otras familias de contaminantes, GC-MS ha sido la técnica de determinación por excelencia empleada para la determinación de retardantes de llama tanto en muestras de agua como en biota. En la Tabla II.22 y Tabla II.23 se recogen de forma esquemática las condiciones de algunas de las investigaciones empleadas para la determinación de los HFRs en muestras acuosas y de biota, respectivamente.

La baja polaridad característica de los FRs los convierte en compuestos aptos para la inyección en GC sin necesidad de realizar una etapa previa de derivatización, simplificando de este modo el proceso de preparación de la muestra.

La inyección en modo *splitless* ha sido la más ampliamente utilizada en GC, empleando en la mayor parte de los casos columnas capilares apolares del tipo DB-5 MS [477,563] o HP-5 MS [423,443] cuyas fases estacionarias están constituidas por un 5 % fenil 95 % dimetilpolisiloxano. Sin embargo, se debe prestar una especial atención al BDE-209, puesto que se trata de un compuesto altamente susceptible de ser degradado térmicamente en el GC, debiéndose por tanto evitar temperaturas superiores a 300 °C en el horno y, de ser necesario, aplicarla al final del programa de temperaturas y durante un breve período de tiempo. Para ello se emplean columnas relativamente cortas (entre 10 y 15 m) con espesor de fase entre 0,1 y 0,2 µm, reduciendo de este modo el tiempo de permanencia en el sistema, proporcionando mejor forma de pico [717,718]. En otros casos

Tabla II.22. Condiciones empleadas para la determinación de FRs en muestras de agua mediante GC-MS o GC-MS/MS.

Análitos	Matriz	Extracción	Inyección	Columna	Detección	LOD o LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
BDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209), BTBPE, DBDPE, DEHTBP, EHTBB (+ PFRs, bromofenoles, bromoanilinas, bromotoluenos y bromoanisoles)	infl., efl.	SPE	splitless	DB-5 MS (15 m x 0,25 mm; 0,10 µm)	(EI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 3 - 130 (BDEs) LODs: 20 - 270 (NFRs)	[538]
BDEs (3, 15, 47, 49, 99, 100, 153, 154)	Milli-Q, grifo, efl., infl.	SPME	splitless	CP-Sil8 CB (25 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs: 0,02 - 0,15	[587]
BDEs (28, 47, 85, 99, 100, 153, 154, 183)	río, grifo, botella	DLLME	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(IT)	LOQs: 2,2 - 113	[563]
BDEs (47, 85, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 197, 206, 207)	Milli-Q	SBSE	PTV-splitless	TRB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,3 - 27,4	[450]
BDEs (28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153, 154) (+ PBBs)	mar	SBSE	splitless	HP-5 MS (15 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 6,9 - 8,6	[449]
BDEs (17, 28, 47, 66, 71, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183, 190)	nieve	SPE	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,00093 - 0,0078	[537]
<i>syn</i> -DP, <i>anti</i> -DP	río	LLE	splitless	DB-5 MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,04 - 0,05	[445]
BDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209)	Milli-Q, río, lago	UA-DLLME	splitless	HP-5 MS (15 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,40 - 2,15	[443]
BDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209) (+ TBPA)	río	SPE	splitless	HP-5 MS (15 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,003 - 0,15	[451]
BDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183)	grifo, río, residual	SPME	splitless	HP-5 MS (15 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,25 - 0,53	[444]

efl.: efluente, infl.: influente.

Tabla II.23. Condiciones empleadas para la determinación de FRs en muestras de biota mediante GC-MS o GC-MS/MS.

Análitos	Matriz	Extracción	Inyección	Columna	Detección	LOD o LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
BDEs (28, 47, 66, 85, 99, 10,0, 138, 153, 154, 183, 203, 209) (+ PCBs)	peces, tiburón, delfín	Soxhlet	splitless	Rtx-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,0001 - 0,022 ww	[480]
BDEs (47, 85, 99, 100, 153, 154)	peces, ranas, serpientes	SLE agitación + DLLME	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS(Q)	LODs: 2,4 - 4,9 dw	[719]
BDEs (3, 15, 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 197, 206, 207, 209) (+ PCBs y DDTs)	mejillón	Soxhlet	splitless	BD-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm) (mono- y hepta-BDEs) DB-1 (15 m x 0,25 mm; 0,10 µm) (octa- y deca-BDEs)	(EI)-MS(Q)	LODs: 0,001 ww	[469]
BDEs (28, 47, 66, 85, 99, 100, 138, 153, 154)	peces	PLE	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs: 0,011 - 0,034 ww LOQs: 0,034 - 0,068 ww	[477]
BDEs (3, 15, 28, 47, 60, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183, 197, 207, 209)	mejillón	Soxhlet	splitless	DB-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(EI)-MS/MS(IT)	LODs < 0,2 dw	[472]
BDEs (17, 28, 47, 66, 75, 99, 100, 153, 154, 183), BTBPE, EHTBB, DEHTBP (+ FRs, pesticidas, PFAAs)	mejillón	PLE	PTV- splitless	DB-XLB (15 m x 0,25 mm; 0,10 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,3 - 6,1 dw (BDEs) 1 dw (NFRs)	[336]
syn-DP, anti-DP (+ otros Dcloranes)	peces	PLE	splitless	DB-5 MS (15 m x 0,10 mm; 0,10 µm)	(NCI)-MS(Q) (NCI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,02 - 0,021 lw LODs: 0,0023 - 0,0055 lw	[425]
BDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154, 209), BTBPE, DP, (+ otros FRs)	peces	PLE	splitless	DB-5 MS (10 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,005 - 1,03 ww	[506]
BDEs (28, 47, 99, 100, 153, 154)	peces	Soxhlet	splitless	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,0034 - 0,018 ww	[423]
BDEs (47, 49, 66, 99, 100, 153, 154) (+PCBs)	mejillón	Soxhlet	splitless	DB-5 MS (30 m x 0,18 mm; 0,10 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: 0,01 - 0,3 dw	[420]
BDEs (28, 47, 49, 66, 77, 85, 99, 100, 138, 153, 154, 183, 209) (+ PCBs)	mejillón	PLE	splitless	DB-1 (15 m x 0,25 mm; 0,10 µm)	(NCI)-MS(Q)	LODs: < 0,02 dw	[471]

DDTs: peticidas organoclorados.

los investigadores seleccionaron columnas del tipo DB-5HT (termo-resistentes) para lograr la separación de los compuestos más pesados, como algunos NFRs o los PBDEs de menor polaridad, favoreciendo de este modo la conservación de la columna [464,502,695].

A diferencia de las otras familias de contaminantes estudiadas y de acuerdo con lo presentado previamente en la Sección II.3.1.3, la NCI ha resultado ser de gran utilidad para la ionización de estos compuestos, permitiendo en muchos casos mejorar la sensibilidad y por tanto disminuir los LODs [423,445,451,506,537]. Sin embargo, no ha sido el único sistema de ionización empleado. El también ha sido ampliamente aceptado y empleado obteniendo también excelentes resultados. Cristale et al. [538] comparan tres modos diferentes de detección, GC-(EI)-MS, GC-(NCI)-MS y GC-(EI)-MS/MS, en donde se puede ver como GC-(NCI)-MS mejora la sensibilidad de todos los PBDEs estudiados ofreciendo LODs más bajos. Sin embargo, a pesar de la ventaja que presenta en cuanto a sensibilidad, debe prestarse especial atención a la coelución de otras especies bromadas, como los derivados metoxilados (MeO-BDEs) o los PBBs, que podrían coeluir en las columnas DB-5 debido a los iones inespecíficos (típicamente Br^-) obtenidos [352]. Entre los diferentes gases de reacción que se pueden emplear en NCI destacan tanto el amoníaco [420,537,538] como el metano [444].

Entre los diferentes sistemas de detección, la MS ha sido y continúa siendo la más empleada [336,425,443,444,538,563,587]. Sin embargo, la presencia de numerosos átomos electronegativos en la estructura ha posibilitado, aunque en menor medida, la detección por medio de los detectores de tipo ECD [439,441,446,457,620,667,700]. Li et al. [440] comparan ambos tipos de sistemas (GC-(NCI)-MS(Q) frente GC-ECD) en la detección de varios PBDEs a partir de muestras de agua residual, demostrando la gran sensibilidad proporcionada por NCI con LODs comprendidos entre 0,18 y 3,6 ng L^{-1} frente a ECD (LODs: 0,97 y 8,8 ng L^{-1}).

3.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

La LC, conocida también como cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), se basa en la distribución selectiva de los analitos entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, y se presenta como una de las técnicas de separación más apropiada para contaminantes no volátiles, polares y/o térmicamente lábiles [508]. La LC deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna cuyos resultados, en términos de selectividad y resolución, han mejorado

mucho por miniaturización y utilización de fases estacionarias muy elaboradas (tamaños de partícula inferior a 5 μm). Las razones de su popularidad son su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Durante los últimos años se comienzan a emplear los sistemas de LC de ultra (alta) resolución (*Ultra (high) Performance Liquid Chromatography*, U(H)PLC) donde el tamaño de partícula de la fase estacionaria es incluso menor (< 2 μm) permitiendo obtener una mayor sensibilidad en el análisis a pesar de tratarse de una instrumentación con un manejo más complejo que requiere equipos más robustos y costosos.

3.2.1 *Sistemas de detección: acoplamiento a espectrometría de masas*

Durante la década de los 80 y 90, la LC se solía acoplar con tipos de detectores con menor sensibilidad como fluorescencia o el UV, y se utilizaba como alternativa de la GC. La técnica de detección más sonada y la más aceptada en la actualidad es la MS en gran parte debido a su polivalencia y su elevada sensibilidad. Para la mayoría de los compuestos, es más sensible y específica que otros detectores de LC, aunque en ocasiones se utiliza para completar la información de estos últimos. El acoplamiento de LC-MS convirtió a la técnica en una de las más sensibles, selectivas y polivalentes, permitiendo la identificación de especies con picos no resueltos.

Del mismo modo que lo explicado el GC (Sección II.3.1.3), una vez formados los iones en la fuente, estos son conducidos hacia el analizador para ser separados según su relación m/z . Los posibles analizadores a utilizar en MS son los mismos que en GC-MS (ver Sección II.3.1.3); y al igual que en GC, LC-MS/MS permite obtener bajos LODs debido a su elevada especificidad. En la presente memoria se ha seleccionado LC-MS/MS(QqQ) trabajando en MRM para la determinación de los PFASs a partir de dos matrices medioambientales diferentes.

Al igual que GC-MS, los principales componentes del sistema LC-MS son el *cromatógrafo de líquidos*, la *interfase*, la *fuentes de ionización*, el *analizador* y el *sistema de detección*. Son necesarias también una o varias bombas de vacío capaces de proporcionar las condiciones de alto vacío que se requieren en el espectrómetro, y un sistema de control y adquisición de datos.

En LC-MS suele encontrarse un pequeño inconveniente en una de sus etapas, que consiste en eliminar el disolvente del eluato cromatográfico manteniendo al mismo tiempo

un nivel de vacío adecuado en el espectrómetro de masas para generar los iones en fase gas. Para subsanar estos problemas se han desarrollado una serie de fuentes de ionización siguiendo diferentes enfoques, aunque son las técnicas de ionización a presión atmosférica (API) las que han triunfado: ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI), ionización química a presión atmosférica (*atmospheric-pressure ionization*, APCI) y fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric-pressure photoionization*, APPI). Entre ellas ESI se ha convertido en una de las más importantes y ha sido empleada en todos los análisis de los PFASs en la presente Tesis Doctoral. En ESI, la disolución de la muestra se nebuliza a través de una aguja capilar que se mantiene a un potencial de varios kV con respecto a un electrodo cilíndrico circundante. Las microgotas cargadas resultantes se desolvatan por repulsiones coulombicas y con la ayuda adicional de flujos de gas y calor, originando iones en fase gas con una o múltiples cargas. Este sistema permite controlar la fragmentación (presencia/ausencia) variando los potenciales de los electrodos y es compatible con MS/MS. Pese a ser la técnica más empleada, es bien conocido que presenta el inconveniente de ser muy sensible a los efectos de matriz, ya que otros componentes presentes en la matriz pueden originar un efecto de competición en la ionización, disminuyendo o incrementando la ionización de los analitos; adicionalmente, pueden competir con ellos en su acceso a la superficie de las gotas del *spray* dificultando su desolvatación, o variar (reduciendo o aumentando) la tensión superficial de las gotas; por lo que en ciertos casos es necesario recurrir a la técnica de adición estándar para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos de interés [720].

3.2.2 Aplicación de LC-MS a la determinación de los compuestos de interés en muestras ambientales

A continuación, se presenta una revisión bibliográfica de la aplicación de la técnica LC-MS a cada una de las familias de contaminantes estudiadas en la presente Tesis Doctoral; recogiendo al final de cada una de ellas unas tablas a modo resumen de las diferentes condiciones empleadas en cada una de ellas.

Parabenes y triclosán

A diferencia de otras familias de contaminantes, los parabenes y el triclosán pueden determinarse también mediante LC, evitando así la etapa previa de derivatización. Las Tabla II.24 y Tabla II.25 recogen las condiciones de LC-MS empleadas para la detección de estos contaminantes a partir de muestras acuosas y de biota, respectivamente. Todos

Tabla II.24. Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de agua mediante LC-MS o LC-MS/MS.

Análitos	Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil (modificador)	Separación y detección	LOD, LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, <i>i</i> -BuP, <i>n</i> -BuP, BzP, Cl ₂ MeP, ClMeP (+ Br ₂ MeP)	efl., infl.	SPE	Halo™ C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,7 µm)	A: H ₂ O (5 mM NH ₄ OAc, pH 4,5 AcOH) B: MeOH (5 mM NH ₄ OAc, pH 4,5 AcOH)	LC-(ESI)-MS/MS(QToF)	LODs: 0,3 - 4,0	[37]
TCS (+ bifenilol)	efl., infl.	SPE	XTerra MS C ₈ (100 mm x 2,1 mm; 3,5 µm)	A: ACN B: H ₂ O (0,02 % NH ₄ OH, pH 10,5)	LC-(ESI)-MS/MS(IT)	LODs: 350	[169]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, <i>i</i> -BuP, <i>n</i> -BuP, BzP, TCS (+EDs)	río, efl.	SPE	Luna C ₁₈ (100 mm x 2 mm; 3 µm)	A: H ₂ O:ACN (80:20) (1 mM NH ₄ OCO) B: ACN	LC-(ESI)-MS/MS(IT)	LODs: 0,2 - 0,5 LOQs: 1,0 - 2,0	[721]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, <i>i</i> -BuP, <i>n</i> -BuP, BzP, TCS (+ TCC)	río, efl., infl.	SPE	Halo™ C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,7 µm)	A: H ₂ O (5 mM NH ₄ OAc) B: MeOH (5 mM NH ₄ OAc)	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LOQs: 0,05 - 0,44 (río) LOQs: 0,12 - 1,1 (residual)	[133]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, BzP, TCS (+ TCC y 5 filtros UV)	río, efl., infl.	SPE	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (50 mm x 4,6 mm; 1,8 µm)	A: H ₂ O (pH 2,8 AcOH) B: MeOH	UPLC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 3 - 10 (efl.) 5 - 10 (infl.)	[134]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, BzP, TCS (+derivados)	efl., infl.	SPE	DBAQ C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,9 µm)	A: MeOH B: H ₂ O (0,1 % CH ₃ O ₂)	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,01 - 10,0 LOQs: 0,1 - 100	[521]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, BzP, TCS (+ PPCPs)	grifo, mar, río, efl., infl.	SPE	Kinetex C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,6 µm)	A: H ₂ O (1,5 mM NH ₄ OAc) B: MeOH (1,5 mM NH ₄ OAc)	UPLC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,1 - 1,8 LOQs: 0,3 - 3,0	[555]
MeP, EtP, <i>i</i> -PrP, <i>n</i> -PrP, BzP (+PPCPs)	río	SPE	BEH C ₁₈ (100 mm x 1 mm; 1,7 µm)	A: H ₂ O:MeOH (80:20) (pH 3,9, 0,5 % CH ₃ COOH, 10 mM TrBA) B: H ₂ O:MeOH (5:95) (pH 5,5, 0,5 % CH ₃ COOH, 10 mM TrBA)	UPLC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,1 - 0,15 LOQs: 0,3 - 0,5	[520]

EDs: disruptores endocrinos, efl.: efluente, infl.: influente, TCC: triclocarbán, AcOH: ácido acético, MeOH: metanol, PPCPs: fármacos y productos de cuidado personal.

Tabla II.25. Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de biota mediante LC-MS o LC-MS/MS.

Analitos	Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil (modificador)	Separación y detección	LOD o LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP (+TBBPA)	peces	SLE agitación	Hypersil gold C ₈ (100 mm x 4,6 mm; 5 µm)	A: H ₂ O B: ACN	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	-	[156]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP (+ BUVSs, OPCs)	peces	QuEChERS-SPE	BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,7 µm)	A: MeOH B: H ₂ O (pH 9 con NH ₃)	UPLC-(ESI)-MS/MS(QqLIT)	LODs: 0,02 - 0,3 dw LOQs: 0,005 - 0,9 dw	[162]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP, TCS (+TCC)	peces	HSSE	Asentis Express C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,7 µm)	A: H ₂ O (0,1 % CH ₂ O ₂) B: MeOH (10 mM NH ₄ OAc)	UPLC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,001 - 0,015 dw LOQs: 0,003 - 0,049 dw	[164]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP, TCS (+TCC, BUVSs, OCPs)	peces	HSSE	Asentis Express C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,7 µm)	A: H ₂ O (0,1 % CH ₂ O ₂) B: MeOH (10 mM NH ₄ OAc)	UPLC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,001 - 0,015 dw LOQs: 0,003 - 0,049 dw	[163]
MeP, EtP, <i>n</i> -PrP, <i>n</i> -BuP(+ filtros UV)	peces	PLE	XBridge™ C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm; 5 µm)	A: ACN B: H ₂ O (0,1 % acetato)	LC-(ESI)-MS/MS(QqLIT)	LOQs: 10 dw	[669]

BUVSs: estabilizantes UV benzotriazoles, TCC: triclocarbán, HSSE: extractor con disolvente a alta velocidad (High Speed Solvent Extraction).

los analitos, incluso los derivados clorados, han sido determinados en alguna ocasión mediante esta técnica. No obstante, aunque con menor frecuencia se han utilizado otros detectores basados en fenómenos espectroscópicos como absorbancia UV [158,168,548,557,574,589] o UV-VIS [511].

La mayor parte de las determinaciones de estos contaminantes se realizan mediante LC [124,133,518,521,556,722]; sin embargo, durante los últimos años están incrementándose el número de investigaciones que emplean U(H)PLC como sistema de separación tras lograr separaciones más rápidas y eficientes [134,137,555,723]. Las técnicas de ionización atmosféricas han sido las preferidas para lograr la ionización de los analitos, siendo ESI en modo negativo la más ampliamente utilizada [132,149,179].

Entre las diferentes columnas empleadas, las fases estacionarias apolares como C_8 [156,169] o C_{18} [37,134,163,521,555,669] han sido las más destacadas, empleando como fases móviles agua/metanol [133,162-164,520] o agua/acetonitrilo [156,669,721]. En la mayor parte de los casos, se incorpora algún tipo de modificador a la fase móvil para favorecer la separación de los analitos a lo largo de la columna, así es el caso del NH_4OAc [37,147,555], NH_4OH [169,197], ácido acético [134], formiato amónico [721] o tributilamina (TrBA) [520].

En la mayor parte de los casos, la detección se realiza mediante MS/MS empleando analizadores del tipo QqQ [133,134,163,164,555], IT [169,721], QToF [37] o sistemas de baja resolución tipo QqLIT [162,669], donde el tercer Q es sustituido por una trampa de iones lineal.

Ácidos perfluoroalquilados

LC-MS y LC-MS/MS son las técnicas analíticas más comunes usadas para la medición de PFASs, sin embargo, tal y como se comentó anteriormente en la Sección II.3.1.4, es difícil obtener blancos analíticos limpios. Para reducir los problemas originales de los blancos de las partes poliméricas situadas en el sistema cromatográfico, se ha propuesto ubicar una precolumna a la salida de la bomba del LC e inmediatamente antes de la columna de separación [724,725]. De este modo, la cantidad de PFOA que contiene el sistema puede ser retenido y eluido después de la inyección del PFOA de la muestra. La Tabla II.26 y Tabla II.27 recogen las condiciones de LC-MS empleadas para la detección de estos contaminantes a partir de muestras acuosas y de biota, respectivamente

Tabla II.26. Condiciones empleadas para la determinación de PFASs en muestras de agua mediante LC-MS o LC-MS/MS.

Análitos	Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil (modificador)	Separación y detección	LOD o LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
PFCAs (C4-C8), PFOS (+ PBs, plasticidas, hormonas, BFRs)	río, grifo	UA-DLLME	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (50 mm x 4,6 mm; 1,8 µm)	A: MeOH B: H ₂ O (5 mM NH ₄ OAc)	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 1 - 24 (río) 1 - 27 (grifo)	[284]
PFCAs (C5-C11), PFASs (C4, C6-C8)	grifo	SPE	BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,7 µm)	A: H ₂ O (2 mM NH ₄ OAc) B: ACN	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,2 LOQs: 0,6	[298]
PFCAs (C4-C14, C16, C18), PFASs (C4, C6, C8, C10)	río, potable	SPE	Betasil™ C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (20 mM NH ₄ OAc) B: MeOH	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,011 - 0,047 (río) 0,022 - 0,10 (potable)	[527]
PFCAs (C5 - C13), PFASs (C4, C6, C8, C10)	superf., mar, residual	SPE	Luna C ₁₈ (250 mm x 2,0 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (2,5 mM NH ₄ OAc) B: MeOH	LC-(ESI)-MS-(ToF)	LODs: 7,5 - 50 (superf.) 8 - 23 (mar) 5 - 50 (residual)	[288]
PFCAs (C5-C14, C16, C18), PFASs (C4, C6, C8, C10)	río	SPE	120 EC - C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,7 µm)	A: H ₂ O (5 mM NH ₄ OAc) B: MeOH (5 mM NH ₄ OAc)	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,006 - 0,036	[726]
PFCAs (C7-C12), PFASs (C4, C6, C8, C10)	río, lago	SPE	XTerra C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm)	A: H ₂ O (2,5 mM NH ₄ OAc) B: MeOH	LC-(ESI)-MS/MS(IT)	LODs: 0,1 - 0,5	[321]
PFCAs (C5-C12), PFASs (C4, C6, C8, C10) (+ PFASs)	grifo	SPE	Zorbax Extend C ₁₈ (150 mm x 1,0 mm; 3,5 µm)	A: H ₂ O:MeOH (95:5) (2,5 mM NH ₄ OAc, 5 mM 1-MP) B: MeOH:ACN:H ₂ O (75:20:5) (2,5 mM NH ₄ OAc, 5 mM 1-MP)	LC-(ESI)-MS/MS(QToF)	LODs: 0,027 - 0,14	[532]
PFCAs (C5, C8, C10), PFASs (C4, C8)	río, efl., estuario, lago	SPE	Betasil C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (1 mM NH ₄ OAc, pH 6) B: MeOH	LC-(ESI)-MS(IT)	LODs: 0,2 - 0,8 (Milli-Q)	[217]

Superf.: superficial, subt.: subterránea, efl.: efluente, 1-MP: 1-metil piperidina, PBs: parabenes.

Tabla II.27. Condiciones empleadas para la determinación de PFASs en muestras de biota mediante LC-MS o LC-MS/MS.

Analitos	Matriz	Extracción	Columna	Fase móvil (modificador)	Separación y detección	LOD o LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
PFCAs (C6-C12, C14), PFASs (C4, C6, C8) (+ PFASs)	peces	SLE sonicación	Ace 3 C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm; 3 µm)	A: MeOH (2 mM NH ₄ OAc) B: H ₂ O (2 mM NH ₄ OAc)	LC-(ESI)-MS(ToF)	LODs: 0,22 - <15 ww	[329]
PFCAs (C5, C8-C10), PFASs (C4, C8) (+ PFASs)	peces	digestión alcalina	LiChroCART-LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (20 mM NH ₄ OAc) B: MeOH (20 mM NH ₄ OAc)	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) LC-(ESI)-MS/MS(IT) LC-(ESI)-MS(QqLIT)	LODs: 0,1 - 0,3 ww LODs: 2 - 3 ww LODs: 0,005 - 0,01 ww	[331]
PFCAs (C4, C8, C10), PFASs (C4, C8)	peces	SLE	Betasil C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (1 mM NH ₄ OAc, pH 6) B: MeOH	LC-(ESI)-MS(IT)	LODs: 2,5 - 10 dw LOQs: 5 - 20 dw	[217]
PFCAs (C5, C8-C10), PFASs (C4, C8, C10) (+PFASs)	peces	PLE	LiChroCART-LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (20 mM NH ₄ OAc) B: MeOH (20 mM NH ₄ OAc)	LC-(ESI)-MS(QqLIT)	LOQs: 0,0015 - 0,05 ww	[636]
PFCAs (C4-C10), PFASs (C+PFASs)	peces	FUSLE	Zorbax Extend C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm; 1,8 µm)	A: H ₂ O:MeOH (95:5) (2 mM NH ₄ OAc, 5 mM 1-MP) B: MeOH:H ₂ O (95:5) (2 mM NH ₄ OAc, 5 mM 1-MP)	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,2 - 0,8 dw	[725]
PFCAs (C4-C14), PFASs (C4, C6, C8)	peces	SLE agitación	Fluorosep RP Octyl (100 mm x 2,1 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (1 mM NH ₄ COOH, pH 4) B: MeOH	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,001 - 0,005 ww LOQs: 0,0025 - 0,01 ww	[727]
PFCAs (C4, C6-C12), PFASs (C4, C6, C8, C10)	moluscos	digestión alcalina	Betasil C ₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 5 µm)	A: H ₂ O (2 mM NH ₄ OAc) B: MeOH	LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)	LODs: 0,1 - 1 dw	[290]

FUSLE: extracción sólido líquido asistida por ultrasonidosocalizada (Focused ultrasound solid-liquid extraction).

LC-MS/MS aplicando ESI en modo negativo es el método instrumental preferido para la determinación de estos compuestos. En algunos estudios, se usa una sola etapa de MS, ya sea mediante IT [217,321,728], Q [526] o ToF [288,329,334]. Un estudio realiza una comparación entre tres tipos de MS para el análisis de PFOS; IT (simple o en tándem), ToF y Q (simple o en tándem), llegando a la conclusión de que el ToF es el que proporcionaba una metodología superior que combina una elevada resolución con una sensibilidad óptima [729]. Sin embargo, puesto que este instrumento no se localiza con facilidad en todos los centros de investigación, el más empleado es QqQ en modo MRM [284,298,335,527,727].

A la hora de realizar la etapa de separación de los analitos, la fase estacionaria más empleada en la bibliografía ha sido C₁₈, puesto que proporciona buenas separaciones para los analitos evaluados en este estudio [8,217,288,297,730].

Por otro lado, la fase móvil más utilizada es la disolución de acetato amónico en agua y en metanol, en concentraciones variables (1 - 20 mM) [8,284,329,636], aunque en algunos casos se ha empleado formiato amónico como disolución tampón [727]. En otras ocasiones se ha utilizado metanol puro, observándose también separaciones adecuadas [284,288,730].

Retardantes de llama

Existen muy pocos estudios en los que LC haya sido seleccionada para la determinación de estos contaminantes, indiferentemente de si se trata de muestras de biota o muestras acuosas [427,447,454,504,546,564]. Entre ellos, la mayor parte emplean detectores del tipo UV [447,454,546,564], mientras que sólo un par de ellos emplean detectores MS [427,504].

En este caso la LC surge como alternativa a los problemas de descomposición térmica que algunos compuestos (principalmente el BDE-209) pueden sufrir en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a causa de las altas temperaturas [718], que influyen en la cuantificación final de los analitos e implican la necesidad de realizar numerosos procedimientos de limpieza del *liner* y cortes de la columna capilar.

A diferencia de las otras familias de contaminantes, la ionización mediante ESI no está muy recomendada con los HFRs puesto que sólo ioniza de un modo eficaz a algunos analitos como los HBCDs o el TBBPA. En la bibliografía, la APPI es la técnica de ionización preferida para la determinación de los PBDEs [731-733].

Bacaloni et al. [427] desarrollaron un método para la determinación simultánea de varios PBDEs (BDE-47, 99, 100, 153 y 154) y TBBPA en muestras de agua de grifo, río y efluentes. Tras la extracción de los analitos mediante SPE (agua grifo) o LLE (río y efluentes) se inyectan los eluatos en un sistema LC-(APPI)-MS/MS(QqLIT) en modo negativo. Los analitos se separan en una columna Alltima C₁₈ (250 mm x 2,1 mm; 5 µm) haciendo pasar una fase móvil isocrática de metanol:agua:acetona (85:5:10), generando LODs comprendidos entre 0,1 y 12 ng L⁻¹ (grifo y río) y LOQs entre 0,2 y 20,3 ng L⁻¹.

Un segundo caso, es la investigación llevada a cabo por Zhou et al. [504] donde se determina la presencia de treinta y seis HFRs, entre los que se encuentran algunos PBDEs (BDE-17, 47, 66, 71, 77, 99, 100, 126, 138, 153, 154, 183, 197, 205, 206 y 209) y algunos NFRs (BTBPE, EHTBB, DEHTBP, DBDPE y los isómeros del DP), en muestras de pescados mediante LC-(APPI)-MS/MS(QqQ). En este caso se selecciona una columna Restek Ultra II C₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,2 µm) con una fase móvil A de metanol:agua (85:15) y una fase móvil B de metanol. Los LOQs de los PBDEs se encuentran en un rango desde 0,0031 y 0,086 ng g⁻¹ ww, mientras que el resto de los analitos (incluidos los NFRs) se encuentran comprendidos entre 0,0061 y 0,37 ng g⁻¹ ww, valores muy similares a los que se pueden obtener con la GC-MS.



III. EXPERIMENTAL



1. PATRONES, REACTIVOS, MATERIAL Y MUESTRAS EMPLEADAS

1.1 PATRONES

1.1.1 *Parabenes y triclosán*

MeP (99 %), EtP (99 %), *n*-PrP (≥ 99 %), *n*-BuP (≥ 99 %) y BzP (99 %) y el TCS (≥ 97 %) han sido suministrados por la compañía Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). *i*-PrP (> 99 %) e *i*-BuP (> 99 %) por TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica). Los derivados halogenados del MeP: ClMeP (98 %) y Cl₂MeP·H₂O (> 99 %) por ABCR GmbH&Co (Karlsruhe, Alemania).

Los ISs, metil 4-hidroxibenzoato-2,3,5,6-d₄ (MeP d₄) y *n*-propil 4-hidroxibenzoato-2,3,5,6-d₄ (*n*-PrP d₄) han sido proporcionados por CDN Isotopes (Quebec, Canadá); y la disolución de ¹³C₁₂ TCS (100 µg mL⁻¹ en nonano, 99 %) por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EEUU).

1.1.2 *Ácidos perfluoroalquilados*

PFHxA (> 97 %), PFHpA (99 %), PFOA (96 %), PFNA (97 %), PFDA (98 %), PFUnA (96 %), PFDaA (98 %) y PFOS (99 %) han sido suministrados por Sigma Aldrich.

Los ISs los comercializa Wellington Laboratories (Guelph, Canadá) como mezcla de varios PFASs marcados con ¹³C de 2 µg mL⁻¹ en MeOH, compuesta por: ¹³C₂ PFHxS (ácido perfluorohexano sulfónico), ¹³C₄ PFOS, ¹³C₄ PFBA (ácido perfluorobutanoico), ¹³C₂ PFHxA, ¹³C₄ PFOA, ¹³C₅ PFNA, ¹³C₂ PFDA, ¹³C₂ PFUnA y ¹³C₂ PFDaA.

1.1.3 *Retardantes de llama*

Las disoluciones estándar del BDE-47 (100 %), 2,2',4,5'-tetrabromodifenil éter (BDE-49, 100 %), 2,3',4',6-tetrabromodifenil éter (BDE-71, $\geq 99,9$ %), BDE-85 (98,5 %), BDE-99 (99,2 %), BDE-100 (100 %), BDE-153 (99,3 %), BDE-154 (100 %), BDE-183 (100 %), BDE-197 (98,1 %) y BDE-209 (≥ 90 %) de 50 µg mL⁻¹ en isooctano; y los patrones sólidos de EHTBB (97,3 %), DBDPE (grado técnico), DEHTBP (99,5 %), TTBPP (97,3 %) y BTBPE (100 %) fueron suministrados por AccuStandard (New Haven, CT, EEUU). Las disoluciones de los dos isómeros del DP (*syn*-DP y *anti*-DP, 99 % ambos) de 100 µg mL⁻¹ en isooctano fueron suministradas por Cambridge Isotope Laboratories.

Como ISs 3,3',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-77, 100 %) y 2,2',3,4,4',5,6-heptabromodifenil éter (BDE-181, 98 %) de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en isooctano fue comprado a AccuStandard. La disolución $^{13}\text{C}_{12}$ BDE-209 (> 98 %) de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ en tolueno fue proporcionada por Wellington Laboratories.

1.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

A continuación, se recoge una lista de los diferentes reactivos y disolventes empleados a lo largo de la presente memoria para el desarrollo de cada una de las investigaciones:

- Acetato amónico (NH_4OAc) (Riedel-de Haën (Seelze, Alemania))
- Acetato de etilo (AcOEt) (grado de análisis cromatográfico, Merck (Darmstadt, Alemania))
- Acetona (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Acetonitrilo (ACN) (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Ácido acético (AcOH) (Merck)
- Ácido clorhídrico (37 %) (Merck)
- Ácido fórmico (98 - 100 %) (Riedel-de Haën)
- Ácido sulfúrico (98 %) (Merck)
- Alúmina (Sigma Aldrich)
- Amoníaco (25 %) (Merck)
- Anhídrido acético (Ac_2O) Acros Organics (Geel, Bélgica)
- Arena (50 - 70 mesh) (Sigma Aldrich)
- Bicarbonato potásico (Sigma Aldrich)
- Bicarbonato sódico (Sigma Aldrich)
- Bromuro de tetrabutilamonio (TBA) (Sigma Aldrich)
- Bromuro potásico (KBr) (Sigma Aldrich)
- C_{18} (200 - 400 mesh) (Sigma Aldrich)
- Carbonato sódico anhidro (extrapuro) (Scharlau (Barcelona, España))
- Ciclohexano (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Cloroformo (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Cloruro cálcico (Riedel-de Haën)
- Cloruro de estroncio hexahidratado (Sigma Aldrich)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (Sigma Aldrich)

- Cloruro potásico (Sigma Aldrich)
- Cloruro sódico (VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, Francia))
- Diclorometano (DCM) (VWR Prolabo)
- Dietiléter (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Disolución amoniaca en metanol (7 mol L^{-1}) (Supelco (Bellefonte, PA, EEUU))
- ENVI-Carb 120/400 (Supelco)
- Florisil (60-100 mesh) (Sigma Aldrich)
- Fluoruro sódico (Merck)
- Hexano (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Hidrogenofosfato potásico (Sigma Aldrich)
- Hidróxido sódico (Merck)
- iBCF (98 %) (Sigma Aldrich)
- Isooctano (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- Metanol (MeOH) (grado de análisis cromatográfico, Merck)
- MTBSTFA (> 97 %) (Sigma Aldrich)
- Piridina (Py) (Merck)
- PSA (Supelco)
- Sílice (Merck)
- Sulfato sódico anhidro (Panreac (Castellar del Vallès, España))
- Tetraborato sódico decahidratado (Merck)
- Tierra de diatomeas (Sigma Aldrich)
- Tolueno (grado de análisis cromatográfico, Merck)

1.3 MATERIAL GENERAL

Para los diferentes trabajos recogidos en la presente memoria se empleó una gran variedad de material de laboratorio. A continuación, se presentan los materiales comunes a todas ellas y posteriormente el material específico empleado en cada una de las técnicas de extracción:

- ✓ Balanza analítica de precisión (Sartorius, modelo BP 211D).
- ✓ Balanza granataria (Sartorius, modelo BP 310S).
- ✓ Barras agitadoras magnéticas recubiertas de Teflón.
- ✓ Bomba de vacío, modelo Aspirator A-35 (Eyela).

III. EXPERIMENTAL

- ✓ Electrodo de membrana de vidrio para medida de pH (Metrohm, modelo 654).
- ✓ Encapsuladores y desencapsuladores.
- ✓ Equipo de filtración de aguas.
- ✓ Estación de concentración por corriente de nitrógeno Turbo-Vap II (Zymark, modelo ZW8005).
- ✓ Estufa (Reyoe).
- ✓ Filtros de fibra de vidrio 47 mm, 0,7 μm de diámetro de poro, 90 % porosidad (Millipore).
- ✓ Filtros de membrana 47 mm, 0,45 μm de diámetro de poro, 79 % porosidad (Millipore).
- ✓ Generador de nitrógeno (Whatman) para alimentar la estación de concentración Mini-Vap.
- ✓ Insertos de 400 μL (Supelco).
- ✓ Insertos de 200 μL (Supelco).
- ✓ Material de vidrio o metal de uso habitual en el laboratorio.
- ✓ Micropipetas automáticas de 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 1-10 mL, (Transferpette Kartell, Eppendorf).
- ✓ Miniconcentrador bajo corriente de nitrógeno Mini-Vap (Supelco).
- ✓ Pipetas Pasteur.
- ✓ Puntas de plástico para diferentes micropipetas.
- ✓ Sistema de purificación de agua A-10 Gradiente Milli-Q (18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$, Millipore; Billerica, MA, EEUU).
- ✓ Soportes, pinzas y nueces.
- ✓ Tapones para viales de 2 mL (Sugelabor).
- ✓ Tapones y septas de elastómero recubierto de Teflón para viales de 10, 22 y 120 mL (Sugelabor).
- ✓ Termómetro.
- ✓ Viales cónicos de vidrio para evaporar.
- ✓ Viales de espacio de cabeza de 10, 22 y 120 mL (Sugelabor).
- ✓ Viales de vidrio ámbar de 4 y 8 mL (National Scientific).
- ✓ Viales de vidrio transparentes de 2 mL (Agilent Technologies).

Material empleado en MASE:

- ✓ Aros de teflón para MASE (Gerstel GmbH).
- ✓ Baño de agua de vidrio termostatzado.

- ✓ Bolsas de polietileno de baja densidad 25 mm x 10 mm (Día).
- ✓ Embudos de acero inoxidable para MASE (Gerstel).
- ✓ Escalpelo estéril (Corysan).
- ✓ Placa agitadora de 6 posiciones (SBS).
- ✓ Sellador térmico CR-200 (Rovebloc).

Material empleado en MSPD:

- ✓ Fritas de polietileno 20 µm para jeringas de 10 mL (International Sorbent Technologies).
- ✓ Jeringas vacías de PP de 10 mL (International Sorbent Technologies).
- ✓ Mortero de vidrio de 100 mL de capacidad.
- ✓ Filtros para jeringas 0,2 µm, 13 mm/Nylon (Millex/Millipore).
- ✓ Jeringas vacías estériles de 2 mL (BD Discardit)

Material empleado en extracción con materiales poliméricos:

- ✓ Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- ✓ Escalpelo estéril (Corysan).
- ✓ Tubo de PES, diámetro 0,7 mm (Membrane GmbH).
- ✓ Vara de PDMS, diámetro 2 mm (Goodfellow).
- ✓ Placa agitadora de 15 posiciones (Variomag Poly, Thermo Scientific).

Material empleado en SPE:

- ✓ Cartuchos Oasis® HLB 6cc, 200 mg (Waters).
- ✓ Cartuchos Oasis® WAX 6cc, 150 mg (Waters).
- ✓ Sistema Visiprep para SPE (Supelco).

1.4 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

1.4.1 *Parabenes y triclosán*

Las disoluciones estándar individuales de cada compuesto se prepararon en metanol a partir de los correspondientes patrones comerciales, mediante pesada en

balanza analítica de precisión. Estas concentraciones oscilaron entre 782,0 hasta 1.084,5 mg L⁻¹. A partir de ellas, se preparó una disolución con la mezcla de todos los componentes en metanol a una concentración de 20 mg L⁻¹, y en función de la necesidad las correspondientes diluciones.

Las disoluciones estándar de los ISs se realizaron partiendo de los patrones comerciales puros. En el caso del *n*-PrP d₄ de 1.044,5 mg L⁻¹ y para el MeP d₄ de 747,8 mg L⁻¹ en metanol. Se preparó una mezcla de ambas de 100 mg L⁻¹. Finalmente, partiendo de esta última disolución y de la disolución de 100 mg L⁻¹ de ¹³C₁₂ TCS, se preparó una mezcla final en metanol de los tres ISs con una concentración de 5 mg L⁻¹.

Todas las disoluciones de patrones se conservaron en recipientes ámbar a -20 °C para evitar su degradación dejándolos atemperar antes de usar.

1.4.2 Ácidos perfluoroalquilados

Las tres investigaciones realizadas con los PFASs, ya sea mediante el uso de PES, SPE o MSPD, se realizaron a partir de disoluciones estándar individuales, preparadas en metanol a partir de los correspondientes patrones comerciales, mediante pesada en balanza analítica de precisión. Estas concentraciones oscilaron entre 1.594,0 hasta 3.560,1 mg L⁻¹. Finalmente, se preparó una disolución con la mezcla de todos los componentes en metanol a una concentración de 20 mg L⁻¹, y en función de la necesidad las correspondientes diluciones.

En cuanto a los ISs, se preparó una disolución de 0,5 mg L⁻¹ en metanol a partir de una dilución de la mezcla comercial.

Al igual que todas las disoluciones de patrones, se conservaron en recipientes ámbar a -20 °C para evitar su degradación dejándolos atemperar antes de usar.

1.4.3 Retardantes de llama

Para estas investigaciones se preparó por un lado una disolución estándar con la mezcla de todos los PBDEs a 5 mg L⁻¹ en isooctano, mientras que por otro lado se realizaron las disoluciones estándar individuales de algunos de los NFRs a partir de los correspondientes sólidos. Las disoluciones estándar de los NFRs individuales se prepararon en tolueno (EHTBB) o mediante la combinación de disolventes para lograr una correcta

disolución del sólido, DBDPE (tolueno:diclorometano, 40:60), BTBPE (tolueno:isooctano, 60:40), TTBPP (isooctano:acetona, 40:60), sonicando en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 10 min para lograr una correcta homogeneización. Se prepararon dos disoluciones con las mezclas de todos los analitos a niveles de 2 mg L^{-1} en diferentes disolventes en función de la matriz de la muestra a estudiar, en acetona para adición de los analitos sobre muestras de aguas, y en isooctano para las muestras de moluscos y la inyección de patrones en el sistema de GC-MS.

Se preparó también una disolución de los ISs a nivel de concentración de 2 mg L^{-1} en isooctano o en acetona para las investigaciones sobre molusco o aguas, respectivamente.

Todas las disoluciones de patrones se conservaron en recipientes ámbar a -20°C para evitar su degradación dejándolos atemperar antes de usar.

1.5 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Durante el período de tiempo que ha comprendido esta investigación se estudiaron muestras medioambientales y biológicas de diferente complejidad. Se establece una diferencia clara a la largo de este estudio entre matrices acuosas, dónde se analizaron diversas muestras de agua con distinta procedencia, y las matrices sólidas, que en este caso se trata de uno de los principales bioindicadores del medio marino como son los moluscos, entre los que se estudiaron mejillón, almeja y berberecho.

A continuación, se presenta a modo resumen la información detallada del tipo de muestras empleadas, tanto para la validación como para la aplicación a muestras reales en cada una de las investigaciones presentadas en esta memoria, proporcionando datos sobre el tipo de muestra, localización y la fecha de muestreo.

1.5.1 Muestras acuosas

Hoy en día el agua está considerada como una de las matrices medioambientales más sencilla, sin embargo, no todas presentan el mismo grado de complejidad. El nivel de contaminación y, en gran medida, el contenido de materia orgánica influyen de manera importante en su análisis, haciendo más sencillo o más complejo su tratamiento. En base a

ello y con el objetivo de desarrollar métodos adecuados para todo tipo de aguas, se analizaron diferentes tipos de muestras acuosas: río, ría, mar y aguas residuales urbanas (efluentes e influentes) procedentes de una planta depuradora.

Debido a la elevada cantidad de sólidos en suspensión que contienen las muestras de agua, principalmente las aguas residuales, y en menor medida las muestras de río y mar, es necesaria una etapa de filtración previa a la extracción de los analitos, a excepción de las extracciones para la determinación de FRs (explicación detallada en Sección IV.2.6.2). En el caso de las muestras de influente y efluente son necesarias dos etapas de filtración: una primera filtración a vacío con filtros de fibra de vidrio de $0,7\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, donde se retira la materia particulada de mayor tamaño, y una segunda filtración a vacío con filtros de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Para los demás tipos de muestras (río, ría y mar) solamente se realiza la filtración con los filtros de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$.

Para la toma de muestras acuosas se emplearon botellas ámbar de 2 L lavadas previamente con agua Milli-Q seguidas de metanol, conservándose en nevera a $4\ ^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

Determinación de parabenos y triclosán mediante MASE

Para efectuar la optimización y validación del método se utilizaron muestras de agua Milli-Q y aguas residuales (efluentes e influentes) recogidas a lo largo del primer semestre del año 2009.

La aplicación del método desarrollado se efectúa con muestras reales, se tomaron muestras de efluentes e influentes de una WWTP (urbanas y hospitalarias) equipada con tratamiento primario y secundario situada en el área de Santiago de Compostela (~100.000 habitantes) en los meses de Septiembre y Octubre del 2009 y Enero del 2010. El río Sar (Santiago de Compostela) presenta una gran importancia en el estudio puesto que es un punto de descarga de las aguas residuales de la WWTP estudiada. El agua superficial fue tomada a 4 km del punto de descarga de la estación depuradora coincidiendo con los días de recogida de muestra en la WWTP. Esto permite realizar un estudio comparativo entre las concentraciones presentes en la planta depuradora y las que se detectan posteriormente en el río.

Determinación de ácidos perfluoroalquilados empleando PES

En los procesos de optimización y validación se utilizaron muestras de aguas superficiales (río y mar) y aguas residuales (efluentes e influentes), todas ellas recolectadas a principios del año 2011. Las aguas superficiales se recogieron de los ríos Sar en Enero del 2011, y del río Lérez (Pontevedra) durante el mes de Marzo del 2011; mientras que las aguas de mar fueron recogidas en zonas costeras de Pontevedra en Enero de ese mismo año. Las aguas residuales fueron tomadas en los meses de Enero y Marzo del 2011 en una WWTP, situada en el área de Santiago de Compostela, equipada con tratamientos primario y secundario.

Las muestras empleadas para la aplicación del método desarrollado fueron una muestra de agua de mar (playa Paxariñas, Pontevedra), una de río (río Lérez, Pontevedra) y una de ría (Marín, ría de Pontevedra) recolectadas entre los meses de Febrero y Marzo del 2011. La muestra de agua residual consiste en una muestra de influente integrado durante 24 horas procedentes de una estación depuradora de aguas residuales (urbanas y hospitalarias) equipada con tratamiento primario y secundario situada en el área de Santiago de Compostela (~100.000 habitantes) recogidas durante la segunda semana del mes de Marzo de 2011.

Determinación de ácidos perfluoroalquilados mediante SPE

Para realizar los procesos de optimización y validación, se utilizaron diversas muestras de aguas: agua de mar artificial (preparada según la bibliografía [734]), aguas de río (río Sar, Santiago de Compostela) y mar (playa Areas, Pontevedra). Estas últimas se recogieron durante los primeros meses del año 2012.

En la aplicación del método desarrollado se seleccionaron muestras de aguas de río provenientes de dos puntos del río Sar en Mayo del 2013 (río 1 - a 1 km de la planta depuradora, y río 2 - a 4 km); y tres muestras de agua de mar recolectadas en tres puntos de la costa suroeste gallega (playa de Montalvo (mar 1), playa de Paxariñas (mar 2) y playa de Areas (mar 3), Pontevedra) en muestreos consecutivos realizados en diferentes semanas del mes de Agosto de 2013.

Determinación de retardantes de llama empleando PDMS

En este caso, para la validación y optimización del método se utilizó una gran variedad de muestras acuosas: muestra de aguas del río Sar (Santiago de Compostela), agua de mar de la costa oeste gallega, (playa Paxariñas, Pontevedra) y muestras de efluente e influente de una planta depuradora de aguas residuales urbanas que recibe las aguas de la ciudad de Santiago de Compostela (~100.000 habitantes). Todas ellas recogidas a lo largo del primer semestre del año 2011.

En cuanto a las muestras empleadas para la aplicación del método, se seleccionó una muestra procedente de los mismos lugares de muestreo que las empleadas en la validación, recolectando en este caso las muestras durante el mes de Julio de 2011. Junto a ellas, se analizó también una muestra de agua de ría (Combarro, Pontevedra) tomada durante el mismo mes.

1.5.2 Muestras sólidas (moluscos)

En el caso de las muestras de sólidas, se emplearon muestras de tres moluscos diferentes con un grado de humedad medio del 80 %: mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), berberecho (*Cerastoderma edule*) y almeja japónica (*Ruditapes philippinarum*). Los diferentes moluscos se someten a una etapa de liofilización previa, en la que el molusco íntegro (sin conchas) se mantiene en el congelador a -18 °C durante al menos 24 horas, salvo el mejillón de batea que precisa mínimo 2 días debido a su gran tamaño. Tras su congelación, las muestras se introducen en el liofilizador para eliminar el agua mediante desecación a vacío a bajas temperaturas (-40 °C y presión inferior a 0,133 mBar) (sublimación). Finalmente, se procede a la trituración de las muestras en un molino de bolas de óxido de circonio para lograr una correcta homogeneización y se conservan en frascos de vidrio ámbar en un lugar alejado de radiación solar y de fuentes de calor para favorecer una conservación uniforme en todas las muestras. El contenido en grasa (%) de cada una de las muestras de moluscos empleados es: ~7 % mejillones, ~3 - 3,5 % en almeja y berberecho.

Determinación de parabenos mediante MSPD

Las etapas de optimización y validación del método se realizaron con una mezcla de mejillones recogidos en diferentes campañas, y con muestras de almejas y berberechos recolectados a lo largo del año 2012 en diferentes puntos de las rías gallegas.

Las muestras empleadas para determinar la concentración de parabenos fueron: dos muestras de mejillones, una de ellas una mezcla de mejillones de batea recolectados a lo largo del 2013 y la otra un mejillón de roca recogido en Octubre de 2012; dos muestras de almeja japónica de Febrero (almeja 1) y Junio (almeja 2) de 2012 y por último dos muestras de berberecho de Febrero del 2012 procedentes, uno de ellos de las rías altas (berberecho 1) y el otro de las rías baixas (berberecho 2).

Determinación de ácidos perfluoroalquilados mediante MSPD

Las etapas de optimización y validación del método se realizaron con una mezcla de mejillones recolectados a finales del 2009 y durante los tres primeros meses del año 2010, y muestras de almejas y berberechos de principios del 2010, provenientes de diferentes puntos de las rías gallegas.

Las muestras empleadas para determinar la concentración de PFASs fueron: dos muestras de mejillones de batea (mejillón 1 - zona rías baixas, mejillón 2 - rías altas), dos muestras de almeja japónica (ambas rías altas) y una muestra de berberecho (rías baixas) cogidas entre Enero y Junio de 2012.

Determinación de retardantes de llama mediante MSPD

Al igual que en los casos anteriores, para validación y optimización del método analítico se emplearon las muestras de una mezcla de mejillón, muestras de almeja y berberecho recolectadas en los meses de Febrero de 2011 en diferentes puntos de las rías gallegas.

Para la aplicación final del método, se utilizaron muestras diferentes a las empleadas en la validación, analizando por tanto dos muestras de mejillón, una de batea y otra de roca, una de berberecho y una de almeja todas ellas procedentes de las costas de Galicia recogidas durante los primeros meses del año 2011.

2. MÉTODOS INSTRUMENTALES: EQUIPOS, CONDICIONES INSTRUMENTALES Y MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

En la siguiente sección se presentan los diferentes métodos cromatográficos empleados para la obtención de las mejores respuestas en cuanto a resolución, sensibilidad y selectividad. También se recoge la información necesaria en cuanto a equipos y condiciones instrumentales para las tres familias de contaminantes emergentes sobre las que se centra la presente memoria.

Los métodos de determinación propuestos utilizan GC acoplada MS, tanto simple (GC-MS) como en tándem (GC-MS/MS), y LC-MS/MS como técnicas de determinación. Mediante la MS en modo simple se identifican las especies presentes en el cromatograma en función de sus espectros de masas, mediante una comparación entre la fragmentación obtenida y la presente en las bibliotecas de espectros. Sin embargo, la posibilidad de trabajar en modo MS/MS permite incrementar la relación S/N y obtener al mismo tiempo mayor selectividad. Por esta razón se selecciona en la mayoría de los trabajos recogidos en la presente Tesis Doctoral, la MS/MS para aumentar la selectividad y reducir los LOQs alcanzados. No obstante, la determinación de los FRs se realizó en todo momento mediante GC-MS empleando NCI como modo de ionización ya que proporciona excelentes resultados para la detección de compuestos halogenados.

2.1 PARABENES Y TRICLOSÁN

2.1.1 *Análisis de muestras de aguas*

La separación y determinación de los compuestos se llevó a cabo con un equipo de GC-MS/MS. Para ello se empleó un cromatógrafo de gases Varian 450 equipado con un detector de masas de IT 240-MS y un inyector automático CP-8400 (Sistemas cromatográficos Varian, Walnut Creek, CA, EEUU). La separación se realizó con una columna HP-5ms (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) de 30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase (5 % fenil - 95 % dimetilpolisiloxano). La inyección de las muestras se empleó mediante un inyector Varian 1079 de PTV equipado con un *liner* fritado desactivado Siltek® (Restek, Bellefonte, PA, EEUU), empleando el modo de LVI. En la Tabla III.1 y Tabla III.2 se recogen los parámetros cromatográficos y los relativos al espectrómetro de masas en tándem, respectivamente.

Tabla III.1. Parámetros cromatográficos empleados en la determinación de parabenos y triclosán mediante GC.

PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS			
PARÁMETRO	VALOR		
Columna cromatográfica	HP-5ms		
inyector	PTV		
Modo inyección	LVI		
Tª inyector	45 °C durante 1 min, rampa hasta 300 °C (200 °C min ⁻¹), manteniendo 10 min		
Relación de <i>split</i>	Tipo	Tiempo (min)	Relación split
	<i>split</i>	0 - 1	75
	<i>splitless</i>	1 - 4	-
	<i>split</i>	4 - 17	80
	<i>split</i>	17 - final	20
Volumen inyección	20 µL		
Flujo gas portador (He)	1 mL min ⁻¹		
Programa de temperaturas	Tª (°C)	Rampa (°C min⁻¹)	Tiempo isoterma (min)
	50	-	4
	270	10	10
			36

Tabla III.2. Parámetros operacionales empleados en la determinación de parabenos y triclosán mediante MS/MS.

PARÁMETROS MS/MS	
PARÁMETRO	VALOR
Modo de ionización	El (70 eV)
Corriente de emisión del filamento	80 µA
Rango de ventana	35 - 500 (<i>m/z</i>)
Modo de adquisición	full scan
Tª manifold	40 °C
Tª trampa de iones	150 °C
Tª fuente de iones	200 °C
Tª línea de transferencia	290 °C
Tiempo de delay	15,80 min
<i>Damping</i> gas (He)	2,5 mL min ⁻¹
Target TIC	2.000 cuentas

El método desarrollado para la determinación de parabenos y triclosán en aguas mediante la inyección en un sistema GC-(EI)-MS/MS(IT) aparece recogido en la Tabla III.3. Siguiendo lo establecido en la normativa SANCO 12571/2013 [735] (actualmente SANTE

III. EXPERIMENTAL

11945/2015 [736]), se seleccionaron un ion producto para la identificación de los compuestos y uno para la identificación de los ISs en el GC-MS/MS. De igual modo y bajo las recomendaciones de la misma normativa, la selección de los correspondientes ISs se realizó de acuerdo con la similitud estructural a los analitos de interés.

Tabla III.3. Condiciones para la determinación de parabenes y triclosán en aguas mediante GC-(EI)-MS/MS(IT) modo no resonante.

COMUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	IÓN PRECURSOR (m/z)	NAE ^d (m/z)	AMPLITUD DE EXCITACIÓN (V)	RANGO DE MASAS (m/z)	IÓN DE CUANTIFICACIÓN (m/z)
MeP d ₄ (IS)	16,14	156	40	31	100 - 166	125
MeP ^a	16,17	152	40	31	100 - 160	121
EtP ^b	17,07	166	40	26	100 - 170	121
<i>i</i> -PrP ^b	17,45	138	40	29	100 - 145	121
<i>n</i> -PrP d ₄ (IS)	18,23	142	40	29	100 - 152	125
<i>n</i> -PrP ^b	18,26	138	40	29	100 - 145	121
<i>i</i> -BuP ^b	18,91	138	40	29	100 - 145	121
<i>n</i> -BuP ^b	19,43	138	40	29	100 - 145	121
BzP ^b	23,58	228	55	31	75 - 235	183
¹³ C ₁₂ TCS (IS)	23,62	302	70	46	100 - 315	230
TCS ^c	23,62	290	70	46	100 - 300	218

^a MeP d₄ usado como IS

^b *n*-PrP d₄ usado como IS

^c ¹³C₁₂ TCS usado como IS

^d NAE Nivel de Almacenamiento de Excitación

2.1.2 Análisis de muestras de moluscos

La separación y determinación de los parabenes se llevó a cabo mediante LC-MS/MS. Para ello se utilizó un cromatógrafo de líquidos consistente en una unidad desgasificadora a vacío (Metachem Technologies, Bath, Reino Unido), dos bombas isocráticas de mezcla en alta presión Varian ProStar 210 (Varian) y un muestreador automático Varian ProStar 410 equipado con un horno cromatográfico capaz de mantener constante la temperatura de la columna entre 20 y 60 (± 5) °C. El sistema incorpora una válvula de seis vías provista de un bucle de 100 µL, aunque ofrece la posibilidad de inyectar volúmenes inferiores de muestra. La separación se realizó con una columna Luna C₁₈

(Phenomenex, EEUU) de 100 x 2,0 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula y de poro de 3,2 μm y 100 Å, respectivamente. El cromatógrafo se acopló a un MS/MS modelo 340-MS (Varian), provisto de una interfase de electrospray y un analizador de masas consistente en un QqQ operando en modo MRM. Tanto el espectrómetro como los diferentes módulos del sistema se controlaron mediante el software MS Workstation 6.9 suministrado por Varian.

Las fases móviles empleadas en la separación fueron: la fase acuosa A, constituida por agua Milli-Q con acetato amónico 5 mM, y la fase orgánica B, formada por metanol con la misma cantidad de acetato amónico. La temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C, el volumen de inyección se fijó en 10 μL y el flujo de fase móvil en 0,2 mL min^{-1} . En las Tablas III.4 y III.5, se recoge el programa de fase móvil empleado y los parámetros operacionales relativos al MS/MS.

Tabla III.4. Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de parabenos.

% A	% B	Tiempo (min:s)
60	40	0:00
35	65	25:00
0	100	25:30
0	100	28:00
60	40	30:00
60	40	33:00

Tabla III.5. Parámetros operacionales comunes empleados en la determinación de parabenos mediante MS/MS.

PARÁMETROS MS/MS	
PARÁMETRO	VALOR
Modo de ionización	ESI negativo
Rango de ventana	1 (m/z)
Modo de adquisición	centroide
Voltaje de la aguja	-4.000 V
Temperatura de la fuente de ionización	50 °C
Temperatura del gas de secado (N_2)	200 °C
Presión del gas de nebulización (N_2)	55 psi
Presión del gas de secado (N_2)	18 psi
Presión del gas de colisión (Ar)	1,5 mTorr

III. EXPERIMENTAL

El método desarrollado para la determinación de parabenes en muestras de moluscos mediante la inyección en un sistema LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) aparece recogido en la Tabla III.6. Siguiendo lo establecido en la normativa SANCO 12571/2013 [735] (actual normativa SANTE 11945/2015 [736]), se seleccionaron dos transiciones para los compuestos y una para los ISs en la determinación mediante LC-MS/MS. De igual modo y bajo las recomendaciones de la misma normativa, la selección de los correspondientes ISs se realizó de acuerdo con la similitud estructural a los analitos de interés, y en función de las recuperaciones relativas obtenidas.

Tabla III.6. Condiciones para la determinación de parabenes en moluscos mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).

SEGMENTO	COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	TRANSICIONES MRM ^c	CV/CE/DT ^d	I ₁ / I ₂ ± tol. ^e
1	MeP ^a	6,26	151 → 92 151 → 136	45 / 20 / 250 45 / 13 / 250	1,9 ± 0,6
	MeP-d ₄ (IS)	6,14	155 → 96	45 / 20 / 250	
	Cl ₂ MeP ^a	7,97	219 → 159 219 → 131	36 / 21 / 250 36 / 31 / 250	10,0 ± 3,0
	EtP ^b	10,37	165 → 92 165 → 136	40 / 22 / 250 40 / 13 / 250	1,5 ± 0,4
	ClMeP ^b	11,17	185 → 125 185 → 169	36 / 20 / 250 36 / 13,5 / 250	2,6 ± 0,8
	<i>i</i> -PrP ^b	15,69	179 → 92 179 → 136	48 / 23 / 400 48 / 15 / 400	1,2 ± 0,4
2	<i>n</i> -PrP ^b	16,97	179 → 92 179 → 136	48 / 23 / 400 48 / 15 / 400	1,7 ± 0,5
	<i>n</i> -PrP-d ₄ (IS)	16,77	183 → 96	48 / 23 / 400	
3	<i>i</i> -BuP ^b	24,37	193 → 92 193 → 136	48 / 22 / 400 48 / 16 / 400	1,8 ± 0,5
	<i>n</i> -BuP ^b	25,10	193 → 92 193 → 136	48 / 22 / 400 48 / 16 / 400	1,7 ± 0,5
	BzP ^b	25,14	227 → 92 227 → 136	48 / 22 / 400 48 / 14 / 400	1,2 ± 0,4

^a MeP d₄ usado como IS

^b *n*-PrP d₄ usado como IS

^c *m/z* ión precursor → *m/z* ión producto

^d Voltaje capilar (V) / energía de colisión (eV) / *dwell time* (ms)

^e Relación intensidad transición 1 / transición 2 ± tolerancia máxima aceptable de acuerdo con la normativa SANCO 12571/2013 [735] (actual SANTE 11945/2015 [736]).

2.2 ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS

La separación de los PFASs para las tres investigaciones desarrolladas a lo largo de esta memoria se realizó con diferentes columnas cromatográficas, flujos y programas de fase móvil; sin embargo, se fijaron los mismos parámetros para la determinación en el MS/MS. Con este fin, se utilizó un cromatógrafo de líquidos consistente en una unidad desgasificadora a vacío (Metachem Technologies), dos bombas isocráticas de mezcla en alta presión Varian ProStar 210 (Varian) y un muestreador automático Varian ProStar 410 equipado con un horno cromatográfico capaz de mantener constante la temperatura de la columna entre 20 y 60 (± 5) °C. El sistema incorpora una válvula de seis vías provista de un bucle de 100 μ L. Para la separación de los analitos se emplearon diferentes columnas, por un lado una Luna C₁₈ (Phenomenex) de 50 x 2,0 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula y de poro de 3,2 μ m y 100 Å, respectivamente, y por otro una Ascentis Expres C₁₈ (Supelco) de 50 x 2,1 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula y de poro de 2,7 μ m y 90 Å, respectivamente. La matriz de esta última columna está compuesta de un núcleo de sólido inerte de 1,7 μ m de diámetro y un armazón poroso de C₁₈ de 0,5 μ m de espesor; diseñada para poder operar a pHs comprendidos entre 2 y 9 unidades. El cromatógrafo se acopló a un MS modelo 1200L (Varian) (investigaciones de extracción con polímeros y MSPD) y al MS modelo 340-MS (Varian) (investigación extracción mediante SPE), ambos provistos de una interfase de electrospray y un analizador de masas consistente en un QqQ operando en modo MRM. Tanto el espectrómetro como los diferentes módulos del sistema se controlaron mediante el software MS Workstation 6.9 suministrado por Varian.

Las fases móviles empleadas en las separaciones fueron: la fase acuosa A, constituida por agua Milli-Q con acetato amónico 5 mM, y la fase orgánica B, formada por metanol con la misma cantidad de acetato amónico. La temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C, el volumen de inyección se fijó en 10 μ L, empleando como flujo de fase móvil 0,4 y 0,2 mL min⁻¹ para las extracciones con polímeros (PES) y MSPD, y SPE, respectivamente. La resolución del primer y el último cuadrupolo se ajustó a 1 amu en ambos casos. La Tabla III.7 recoge los diferentes programas de fases móviles empleados para la separación cromatográfica, las columnas seleccionadas y los correspondientes flujos de fase móvil para los PFASs en función de la técnica de extracción; y en la Tabla III.8 los parámetros operacionales relativos al espectrómetro de masas en tándem.

III. EXPERIMENTAL

Tabla III.7. Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de los PFASs.

EXTRACCIÓN CON POLÍMEROS			EXTRACCIÓN MEDIANTE SPE			EXTRACCIÓN MEDIANTE MSPD		
% A	% B	Tiempo (min:s)	% A	% B	Tiempo (min:s)	% A	% B	Tiempo (min:s)
60	40	0:00	95	5	0:00	60	40	0:00
60	40	1:00	25	75	15:00	60	40	1:00
25	75	7:00	0	100	16:00	25	75	7:00
25	75	11:00	0	100	18:00	25	75	11:00
60	40	11:01	95	5	19:00	60	40	11:01
60	40	14:00	95	5	22:00	60	40	14:00
Columna		Luna C ₁₈	Ascentis Expres C ₁₈		Ascentis Expres C ₁₈		Ascentis Expres C ₁₈	
Flujo (mL min ⁻¹)		0,4	0,2		0,4		0,4	

Tabla III.8. Parámetros operacionales comunes empleados en la determinación de PFASs mediante MS/MS.

PARÁMETROS MS/MS	
PARÁMETRO	VALOR
Modo de ionización	ESI negativo
Rango de ventana	1 (m/z)
Modo de adquisición	centroide
Voltaje de la aguja	-4.000 V
Temperatura de la fuente de ionización	50 °C
Temperatura del gas de secado (N ₂)	200 °C
Presión del gas de nebulización (N ₂)	55 psi
Presión del gas de secado (N ₂)	18 psi
Presión del gas de colisión (Ar)	1,5 mTorr

Todas las diferentes condiciones se presentan recogidas en la Tabla III.9. Para la identificación de los analitos en los tres trabajos desarrollados se seleccionaron 2 y 1 transiciones para los compuestos de interés y los ISs, respectivamente, de acuerdo con los establecido en la normativa SANCO 12571/2013 [735] (actual SANTE 11945/2015 [736]).

Tabla III.9. Condiciones para la determinación de PFASs en aguas y moluscos mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).

SEGMENTO	COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)			TRANSICIONES MRM ^b	CV/CE/DT ^c	I ₁ / I ₂ ± tol. ^d
		PES	SPE	MSPD			
1	PFHxA	2,2	10,8	5,23	313 → 269 313 → 119	30 / 8 / 200 30 / 19 / 200	14,9 ± 4,5
	¹³ C ₂ PFHxA (IS)	2,2	10,8	5,24	315 → 270	30 / 8 / 200	
2	PFHpA ^a	3,7	12,8	6,58	363 → 319 363 → 169	30 / 8 / 400 30 / 16 / 400	3,4 ± 1,0
3	PFOA	4,9	14,1	7,57	413 → 369 413 → 169	30 / 8 / 200 30 / 16 / 200	2,2 ± 0,7
	¹³ C ₄ PFOA (IS)	4,9	14,1	7,58	417 → 372	30 / 8 / 200	
4	PFNA	5,9	15,2	8,39	463 → 419 463 → 219	30 / 8,5 / 100 30 / 15 / 100	3,2 ± 1,0
	¹³ C ₅ PFNA (IS)	5,9	15,2	8,39	468 → 423	30 / 8,5 / 100	
					499 → 499*	150 / 20 / 100	13,3 ± 4,0 ^e
	PFOS	5,9	15,3	8,41	499 → 99 499 → 80	96 / 27 / 100 96 / 45 / 100	
	¹³ C ₄ PFOS (IS)	5,9	15,3	8,41	503 → 80	95 / 45 / 100	14,6 ± 4,4 ^f
							1,1 ± 0,3 ^g
5	PFDA	6,8	16,1	9,19	513 → 469 513 → 219	30 / 8,5 / 200 30 / 16 / 200	3,5 ± 1,1
	¹³ C ₂ PFDA (IS)	6,8	16,1	9,19	515 → 470	30 / 8,5 / 200	
6	PFUnA	7,5	16,9	10,27	563 → 519 563 → 269	30 / 9,5 / 200 30 / 16 / 200	4,8 ± 1,4
	¹³ C ₂ PFUnA (IS)	7,5	16,9	10,26	565 → 520	30 / 9,5 / 200	
7	PFDoA	8,1	17,4	11,88	613 → 569 613 → 169	30 / 9,5 / 200 30 / 24 / 200	3,8 ± 1,1
	¹³ C ₂ PFDoA (IS)	8,1	17,3	11,87	615 → 570	30 / 9,5 / 200	

* Pseudo-transición empleada únicamente para el método de SPE

^a ¹³C₄ PFOA usado como IS^b m/z del ión precursor → m/z del ión producto^c Voltaje capilar (V) / energía de colisión (eV) / dwell time (ms)^d Relación intensidad transición 1 / transición 2 ± tolerancia máxima aceptable de acuerdo con la normativa SANCO 12571/2013 [735] (actual SANTE 11945/2015 [736]).^e relación entre la señal de la transición 499 → 499 y 499 → 99^f relación entre la señal de la transición 499 → 499 y 499 → 80^g relación entre la señal de la transición 499 → 99 y 499 → 80

Las condiciones experimentales para la determinación de los siete PFCAs mediante LC-MS/MS se basaron en los trabajos previos de extracción mediante polímeros (PES) y extracción mediante MSPD. Sin embargo, para el trabajo de SPE, las transiciones MRM típicamente empleadas para el PFOS [737], desde el anión molecular $[M-H]^-$ hasta el producto de iones m/z 80 ($[SO_3]^-$) y m/z 99 ($[SO_3F]^-$), proporcionaban bajas intensidades en el equipo impidiendo la obtención de los LODs deseados, requisito indispensable de esta investigación que busca LODs inferiores a las concentraciones máximas establecidas en la normativa presentada por la Unión Europea [266]. Esto puede ser atribuido a una eficacia de transmisión pobre de las masas bajas en nuestro sistema LC-MS/MS, ya detectados para otros analitos [133]. Por tanto, en el caso del PFOS fue necesario emplear una *pseudo*-transición MRM con la que se elimina el ruido de fondo al incrementar la energía de colisión mientras que el anión molecular del analito permanece intacto [738]. Al mismo tiempo, se emplearon las transiciones reales MRM (m/z 499 > m/z 80 y m/z 499 > m/z 99) para la confirmación.

2.3 RETARDANTES DE LLAMA

La separación y determinación de los FRs se realizó con un equipo de GC-MS para ambas investigaciones desarrolladas en la presente Tesis Doctoral. Para ello se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 7890A equipado con un inyector automático 7683B y un puerto de inyección *split/splitless* acoplado a un detector de espectrometría de masas con un Q 5975C (Agilent Technologies). La separación se realizó con una columna capilar DB-5HT (Agilent Technologies) de 15 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,1 μ m de espesor de fase (5 % fenil - 95 % dimetilpolisiloxano), diseñada para resistir temperaturas elevadas comprendidas entre 60 y 400 °C. El modo de ionización empleado en el espectrómetro de masas fue la ionización química en modo negativo con CH_4 como gas de reacción. En la Tabla III.10 se recogen los parámetros cromatográficos y en la Tabla III.11 aquellos relativos al espectrómetro de masas. Los compuestos se analizan en modo SIM, en donde diferentes grupos de analitos con específicos iones *target* se monitorizan a diferentes tiempos de ventana definidos por los correspondientes tiempos de retención, fijando el *dwell time* desde 25 a 50 ms.

Se presenta también el método de detección empleado para la determinación y cuantificación de los FRs en las dos matrices ambientales de interés (agua y moluscos). La Tabla III.12 recoge las diferentes condiciones empleadas del método GC-(NCI)-MS(Q) aplicado a los dos tipos de matrices, por un lado, el estudio del TTBP, únicamente determinado para las muestras acuosas debido a su elevado carácter hidrofílico, y por otro,

en cuanto a la diferencia en el uso de algunos ISs para la corrección de los resultados proporcionados por algunos analitos, como por ejemplo BDE-154 y los isómeros del Declorane Plus, establecidos en base a los resultados experimentales. Los ISs surrogados para cada PBDEs fueron seleccionados de acuerdo con la ISO 22032:2006 [680], mientras que para los NFRs se escogieron de nuevo en base a los resultados experimentales obtenidos durante la validación del método. Siguiendo también en este caso lo establecido en la normativa SANCO 12571/2013 [735] (actual SANTE 11945/2015 [736]) y teniendo en cuenta que se trata de una determinación empleando un único análisis mediante MS, se asociaron tres iones (m/z) para la detección de los analitos, siendo el primero de ellos el empleado para la cuantificación y los dos últimos para la confirmación (iones de cualificación). En el caso de los compuestos BDE-154 y BDE-153 fue necesario establecer el ion 160,7 (corresponde con HBr_2^-) como cuantificador puesto que cuando se aplica la técnica GC-(NCI)-MS con columnas capilares no polares pueden coeluir con algunos otros analitos, como el 2,2',4,4',5,5'-hexabromobifenilo (BB-153) y el TBBPA que proporciona también señal con los m/z 79,0 y 81,0 [680].

Tabla III.10. Parámetros cromatográficos empleados en la determinación de FRs.

PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS				
PARÁMETRO	VALOR			
Columna cromatográfica	DB-5HT			
inyector	split/splitless			
Modo inyección	splitless 1,5 min			
Relación split	1:50			
Tª inyector	300 °C			
Volumen inyección	1 µL			
Flujo gas portador (He)	1 mL min ⁻¹			
Programa de temperaturas	Tª (°C)	Rampa (°C min ⁻¹)	Tiempo isoterma (min:s)	Tiempo total (min)
	80	-	1:30	1,5
	220	60	-	3,83
	250	30	-	4,83
	270	5	-	8,83
	325	10	-	14,33
	325	-	5:00	19,33

III. EXPERIMENTAL

Tabla III.11. Parámetros operacionales empleados en la determinación de FRs mediante (NCI)-MS.

PARÁMETROS MS	
PARÁMETRO	VALOR
Modo de ionización	NCI
Corriente de emisión del filamento	50 μ A
Modo de adquisición	SIM
Tª cuadrupolo	150 °C
Tª fuente de iones	150 °C
Tª línea de transferencia	280 °C
Tiempo de delay	2,9 min

Tabla III.12. Condiciones para la determinación de compuestos FRs en aguas y moluscos mediante GC-(NCI)-MS(Q).

SEGMENTO	COMPUESTO PDMS	COMPUESTO MSPD	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	m/z^d
1	BDE-47 ^a	BDE-47 ^a	5,04	79,0, 81,0, 160,7
	BDE-77 (IS)	BDE-77 (IS)	5,27	79,0, 81,0, 325,7
	BDE-100 ^a	BDE-100 ^a	5,56	79,0, 81,0, 160,7
	BDE-99 ^a	BDE-99 ^a	5,74	79,0, 81,0, 160,7
	EHTBB ^b	EHTBB ^b	5,78	79,0, 81,0, 356,6
	BDE-85 ^a	BDE-85 ^a	6,11	79,0, 81,0, 160,7
	BDE-154 ^a	BDE-154 ^b	6,35	160,7, 79,0, 81,0
	BDE-153 ^b	BDE-153 ^b	6,72	160,7, 79,0, 81,0
2	BDE-183 ^b	BDE-183 ^b	8,08	79,0, 81,0, 561,4
	BTBPE ^b	BTBPE ^b	8,60	79,0, 81,0, 251,7
	BDE-181 (IS)	BDE-181 (IS)	8,97	79,0, 81,0, 561,4
3	DEHTBP ^b	DEHTBP ^b	9,55	383,6, 79,0, 81,0
	<i>syn</i> -DP ^c	<i>syn</i> -DP ^b	9,62	653,3, 651,6, 655,6
	<i>anti</i> -DP ^c	<i>anti</i> -DP ^b	10,04	653,3, 651,6, 655,6
	BDE-197 ^b	BDE-197 ^b	10,09	408,5, 79,0, 81,0
4	BDE-209 ^c	BDE-209 ^c	14,26	486,5, 484,5, 482,5
	¹³ C BDE-209 (IS)	¹³ C BDE-209 (IS)	14,26	494,5, 492,5, 496,5
5	TTBPP ^a	-	14,50	938,4, 936,4, 940,4
	DBDPE ^b	DBDPE ^b	15,32	79,0, 81,0, 493,0

^aBDE-77 usado como IS

^bBDE-181 usado como IS

^c¹³C₁₂ BDE-209 usado como IS

^d primer ión: ión de cuantificación; segundo y tercer ión: ión cualificadores.

Teniendo en cuenta también que se utiliza una columna de GC más corta de lo habitual para mejorar la detección de los analitos más pesados (BDE-209, DBDPE, etc.), se comprobó nuevamente la resolución de la misma para cumplir con el método 1614 de la EPA [679]. De acuerdo con esto, los congéneres BDE-49 y BDE-71 deben estar resueltos como mínimo al 40 % del valle. Con la columna de GC seleccionada y el programa de temperaturas empleado en esta investigación, se logra una separación de valle del 4 % con respecto al pico de menor tamaño, cumpliendo en todo momento con el criterio de la EPA.



3. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN OPTIMIZADOS

3.1 EXTRACCIÓN DE PARABENES Y TRICLOSÁN MEDIANTE MASE

La extracción con MASE se lleva a cabo utilizando membranas de polietileno de baja densidad (LDPE). Este material polimérico fue adquirido en un supermercado local en el que se dispensa como bolsas para la congelación de alimentos (espesor de membrana 0,02 mm). Las bolsas de membranas se prepararon manualmente con ayuda de un bisturí y de un sellador térmico, con tamaños de 25 x 10 mm y con capacidad para 400 μL de disolvente. Tras la preparación de las bolsas, se cortaron cuidadosamente los extremos de las mismas reduciendo así la cantidad de material polimérico que podría adsorber los analitos del estudio. Estas membranas, al igual que las membranas comerciales de polipropileno (PP), necesitan una etapa previa de acondicionamiento, que consiste en la inmersión de las mismas en un disolvente adecuado durante al menos 24 horas antes de su utilización. En este caso, las membranas de LDPE se acondicionaron en cloroformo y se conservaron en el mismo disolvente hasta su utilización. Para su uso, una vez acondicionadas las membranas se montan de manera individual sobre un embudo metálico y se fijan mediante un anillo de teflón. En la Figura III.1 se presenta una fotografía de las membranas comerciales y las membranas utilizadas en este estudio. Debido al bajo precios de las membranas utilizadas en este estudio, éstas no fueron reutilizadas para evitar posibles problemas de contaminación cruzada.



Figura III.1. Membranas comerciales (derecha) y membranas de LDPE (izquierda).

En la Figura III.2 se muestra a modo resumen un esquema del protocolo de preparación de la muestra llevado a cabo en este trabajo tras optimizar los diferentes parámetros de la etapa de extracción. Inicialmente, en un vial de 22 mL se introducen 0,2 g de K_2HPO_4 , 18 mL de la muestra a analizar, 200 μL de anhídrido acético (agente derivatizante) y 100 ng L^{-1} de los ISs, junto a ellos introducimos una barra agitadora.

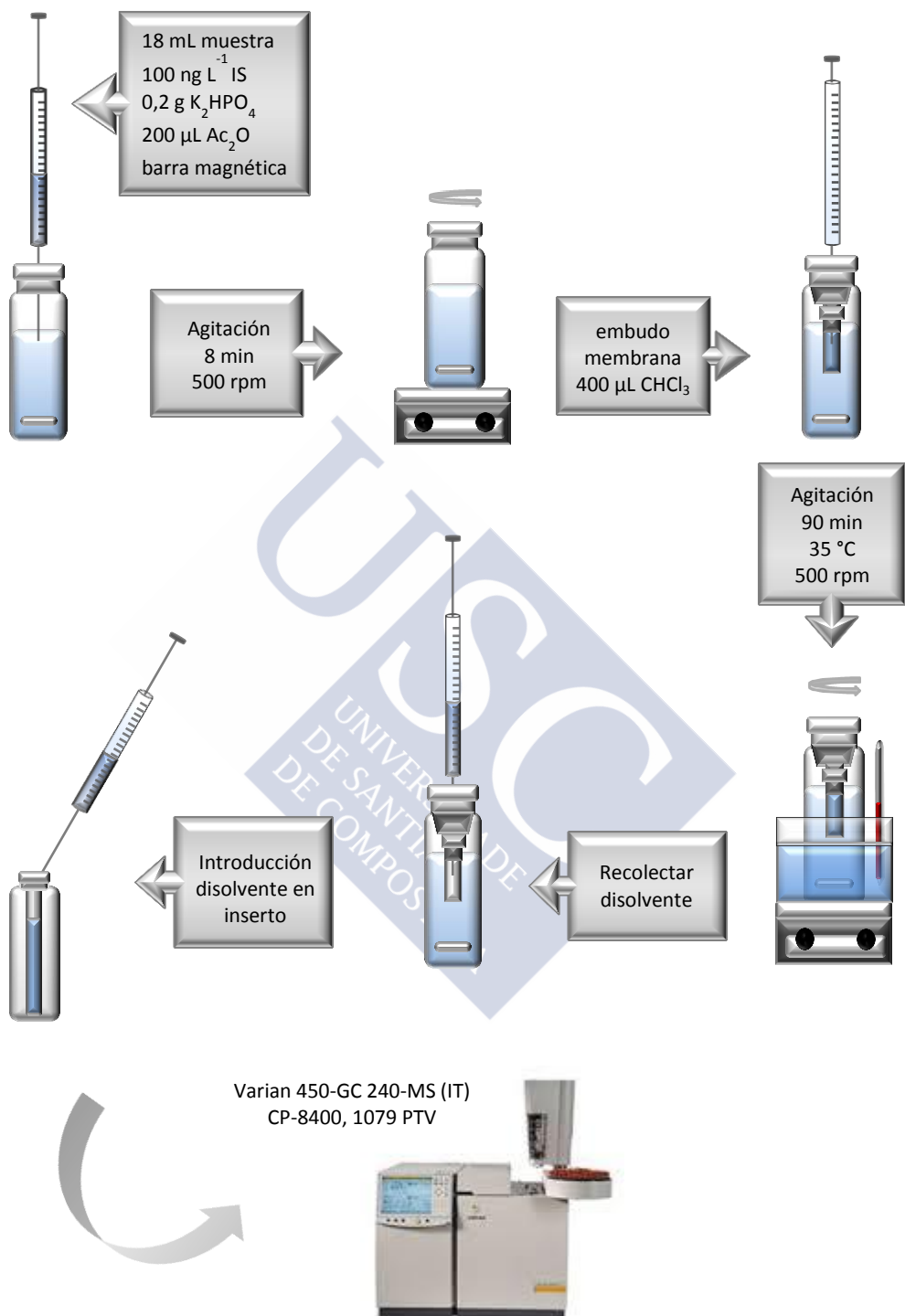


Figura III.2. Esquema optimizado de la extracción de parabenes y triclosán en aguas mediante MASE.

A continuación, se efectúa una etapa de preagitación en la que la mezcla se agita durante 8 minutos a 500 rpm. Al finalizar este tiempo, se colocan los montajes anteriormente citados de las membranas con los embudos sobre la parte superior de cada vial, tal y como se muestra en la Figura II.6. Se introducen 400 μ L de cloroformo en el interior de las membranas, se cierran los viales y se mantienen bajo agitación magnética a 500 rpm durante 90 minutos a 35 °C en un baño de agua termostatzado para que tenga lugar la extracción de los analitos. En el baño de agua se sitúa al mismo tiempo un termómetro para poder realizar un seguimiento controlado de la temperatura garantizando una temperatura constante durante todo el proceso.

Una vez terminado el tiempo de extracción, se retiran los viales del baño y se procede a la recogida del volumen de disolvente que queda en el interior de las membranas introduciéndolo finalmente en un inserto de 400 μ L situado en un vial de 2 mL. Quedando de este modo listo para su introducción en el sistema (PTV)-GC-(EI)-MS/MS(IT).

El procedimiento de extracción pudo realizarse de forma simultánea para seis muestras empleando para ello una placa agitadora multiposicional, reduciendo así significativamente el tiempo total de extracción para un lote de muestras.

3.2 EXTRACCIÓN DE PARABENES Y TRICLOSÁN MEDIANTE MSPD

Antes de comenzar la extracción de los analitos, es necesario llevar a cabo una etapa de limpieza del material adsorbente (C_{18}) y el soporte sólido (sílice) empleados con ACN (aprox. 30 mL), con el objetivo de eliminar las impurezas presentes en los materiales y reducir al mismo tiempo la señal de algunos analitos en los blancos (ver en Sección IV.2.2.3). Ambos materiales se conservan en recipientes ámbar de vidrio a temperatura ambiente hasta su utilización.

En la Figura III.3 se muestra a modo resumen un esquema del protocolo de preparación de la muestra llevado a cabo en esta investigación tras haber optimizado los diferentes parámetros que afectan a la etapa de extracción. Inicialmente, las muestras liofilizadas de molusco se homogeneizan junto con la sílice (soporte sólido o agente dispersante) en un mortero de vidrio, tomando 0,5 y 1,2 g, respectivamente. La homogeneización debe ser realizada a conciencia, puesto que es en esta etapa donde tiene lugar la extracción de los analitos desde la matriz hacia el soporte sólido.

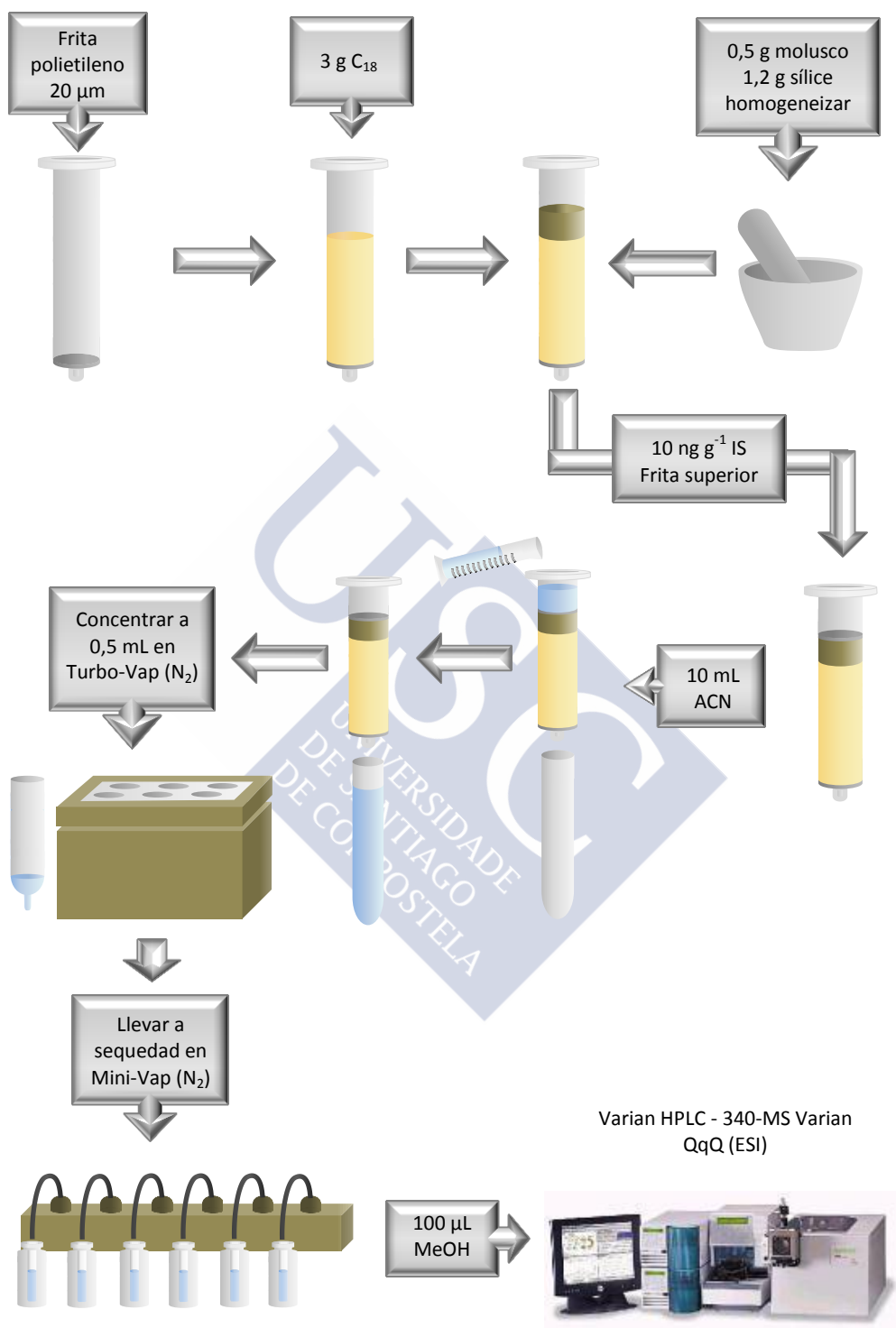


Figura III.3. Esquema optimizado de la extracción de parabenes en moluscos mediante MSPD.

A continuación, se procede al llenado de la jeringa donde tendrá lugar de forma simultánea la elución de los compuestos y la etapa de limpieza de la muestra. Para ello, debe situarse una frita de polietileno de 20 μm en la parte final de la jeringa con el fin de retener las partículas sólidas que pueden salir al mismo tiempo que se eluyen los analitos. Posteriormente, se sitúan 3 g de C_{18} empleado como agente adsorbente encargado de realizar la etapa de limpieza del extracto o, más correctamente, encargado de la retención de las partículas lipídicas presentes en la matriz de la muestra. La mezcla homogeneizada previamente entre muestra y soporte sólido se dispondrá en el nivel superior al adsorbente, adicionando sobre su superficie 10 ng g^{-1} de ISs dejándolo penetrar durante al menos 15 min. Todo lo anterior se cubre con una última frita para evitar la dispersión de las partículas una vez que se adicione el disolvente orgánico de elución. Seguidamente, se procede a la elución de las analitos mediante la adición de 10 mL de ACN y a la evaporación del eluato bajo corriente de N_2 hasta aproximadamente 0,5 mL en el Turbo-Vap continuando con una evaporación hasta sequedad en el Mini-Vap, realizando los correspondientes lavados con MeOH. Finalmente, se reconstituye con 100 μL de MeOH para su inyección en el equipo LC-MS/MS.

3.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE EXTRACCIÓN CON ADSORBENTES POLIMÉRICOS DE BAJO COSTE

La extracción de los analitos se lleva a cabo utilizando barras de PDMS y tubos de PES. El procedimiento se realiza empleando secciones de 1 cm de longitud de cada polímero cortadas con ayuda de un bisturí en el laboratorio. Posteriormente, se efectuó un doble lavado con fracciones limpias de metanol conservando las porciones de los polímeros como mínimo durante un día en el mismo disolvente y secándolas con toallitas libres de pelusas antes de su utilización.

La Figura III.4 recoge un resumen esquemático del protocolo de preparación de muestra, empleando PES como material polimérico extractante, tras optimizar los diferentes parámetros que afectan a la etapa de extracción y desorción de los compuestos de interés. Inicialmente, se realiza una primera etapa donde tendrá lugar la extracción de los analitos. Con este fin, se introduce en un vial de vidrio transparente 100 mL de la muestra a un pH de 9,5, adicionando a continuación TBA hasta una concentración de 56 mM, una barra de agitación magnética, 200 ng L^{-1} de ISs y el tubo del material extractante (PES). Una vez incorporados todos los reactivos necesarios se mantiene bajo agitación magnética a 500 rpm durante 14 horas.

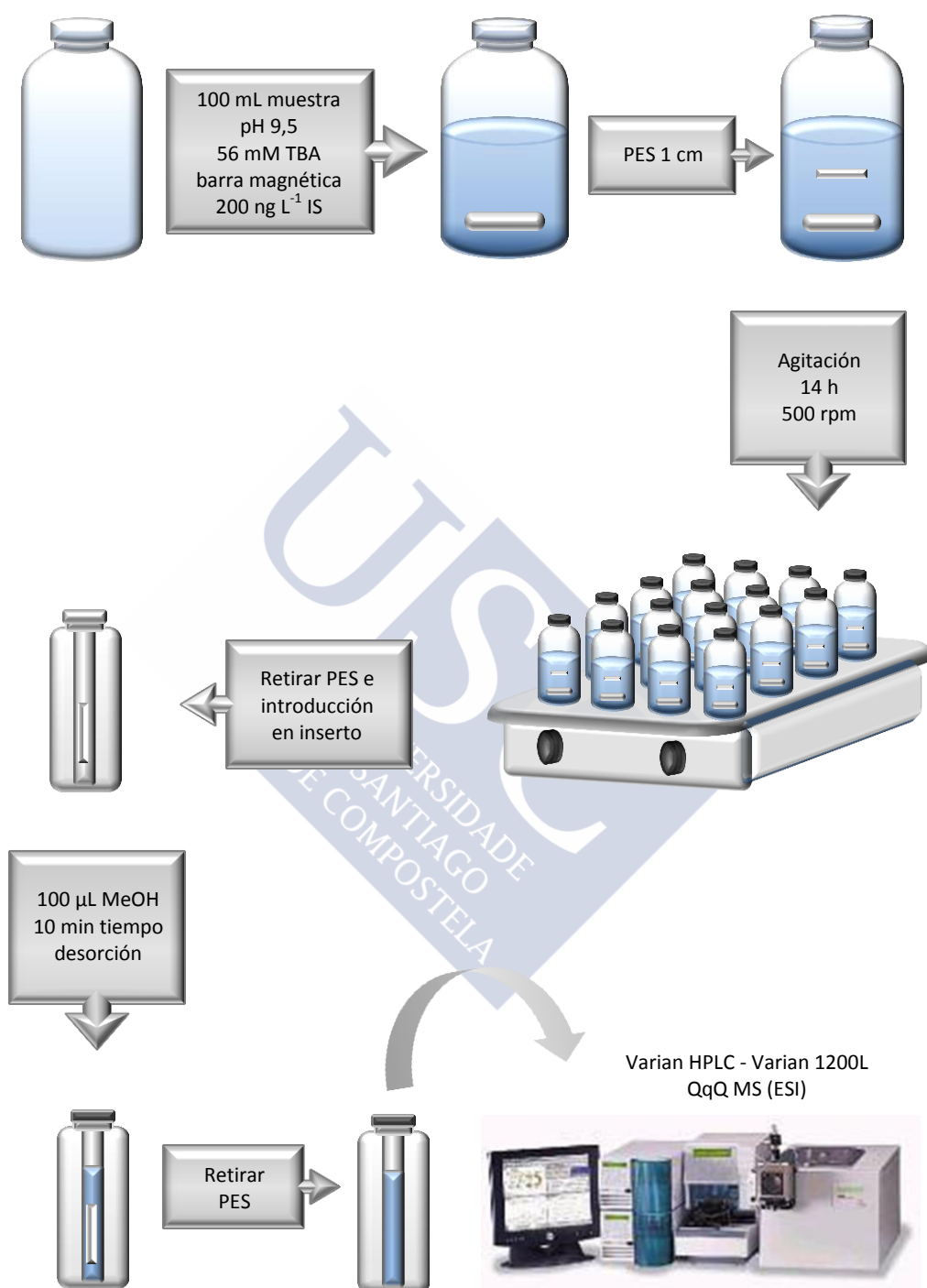


Figura III.4. Esquema optimizado de la extracción de los PFASs en aguas mediante extracción con adsorbentes poliméricos de bajo coste.

Una vez finalizado el proceso de extracción, comienza la segunda etapa en la que se llevará a cabo la desorción de los compuestos. Para ello, se retira la fibra del interior del vial y se sitúa en el interior de un inserto de 200 μL emplazado en un vial de 2 mL transparente con tapa de rosca. Se emplea la desorción con disolventes como método de desorción de los analitos desde el material polimérico, utilizando para ello 100 μL de metanol que se añaden en el inserto junto con el tubo de PES. Tras 10 min a temperatura ambiente, se retira el tubo de PES del interior del inserto y se inyecta el contenido del inserto directamente en el LC-MS/MS.

El procedimiento anterior está optimizado para la fibra de PES, puesto que es la que proporciona mejores resultados. El método a seguir para la extracción con PDMS es el mismo, salvo por la necesidad de adicionar un 10 % de NaCl en la muestra. El porcentaje de sal dependerá del tipo de muestra a analizar, ya que las aguas de mar contienen normalmente un 6,8 % y no se requieren cantidades más elevadas, siendo necesario únicamente adicionar la diferencia.

3.4 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE SPE

El procedimiento de extracción mediante SPE llevado a cabo en esta investigación se presenta recogido de forma esquemática en la Figura III.5. Las extracciones se realizaron empleando cartuchos Oasis® HLB de 200 mg (6 cc) y, al igual que todos los procedimientos de SPE, se realizó cumpliendo una serie de etapas necesarias para su correcto funcionamiento. Inicialmente, se realiza el acondicionamiento del cartucho haciendo pasar 10 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua Milli-Q. A continuación, se pasa 1 L de la muestra a analizar con 2 ng L⁻¹ de los correspondientes patrones internos. El objetivo de la etapa de lavado es la eliminación de las impurezas que se hayan podido quedar retenidas en el cartucho tras el paso de la muestra, para ello se hacen pasar 5 mL de agua Milli-Q (10 % de MeOH). Seguidamente, se secan los cartuchos durante 30 min bajo una corriente de N₂ para la eliminación por completo de las posibles moléculas de agua. Finalmente, se procede a la elución de los analitos retenidos en el cartucho con 10 mL de metanol y a la consecutiva eliminación del disolvente orgánico mediante una etapa de evaporación bajo corriente de N₂, primero hasta alcanzar volúmenes próximos a 0,5 mL empleando para ello el Turbo-Vap, y posteriormente se sitúa en el Mini-Vap hasta lograr una completa evaporación. Todos los lavados realizados en las etapas de secado se realizan empleando metanol como disolvente. Para finalizar, el extracto se reconstituye con 100 μL de metanol quedando ya listo para su inyección en el sistema LC-MS/MS.

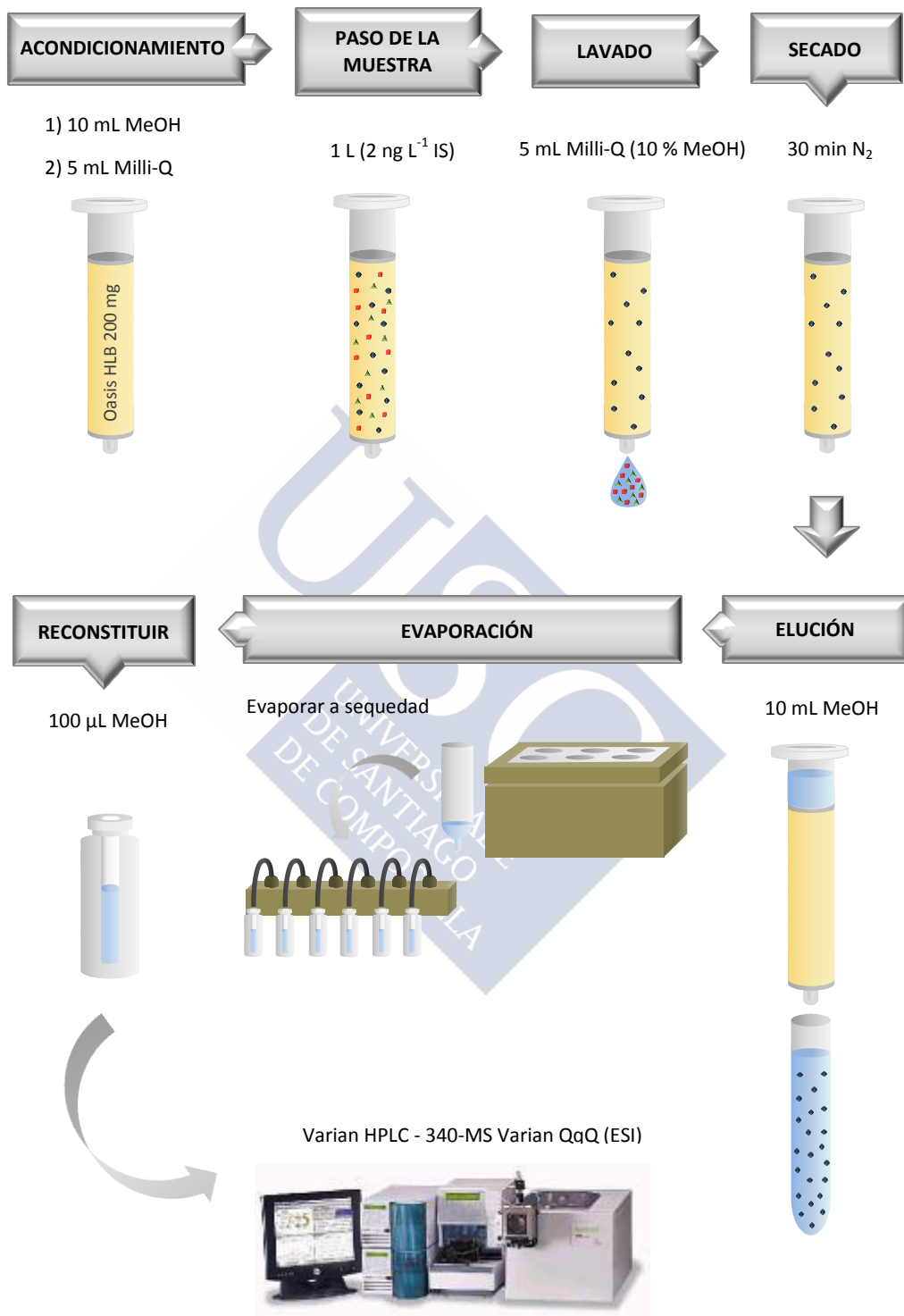


Figura III.5. Esquema optimizado de la extracción de PFASs en aguas mediante SPE.

3.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE MSPD

El procedimiento optimizado empleado para lograr la extracción de los PFASs de las muestras de moluscos se muestra recogido de forma esquemática en la Figura III.6.

Esta técnica de extracción se puede decir que se encuentra dividida en dos etapas diferentes. Inicialmente tiene lugar una etapa de extracción de los analitos desde la matriz, en donde, en este caso, 0,5 g de molusco liofilizado mezclan con 0,2 g de tierra de diatomeas (soporte sólido o agente dispersante) en un mortero de vidrio hasta lograr una homogeneización total de la mezcla. La correcta homogeneización es un factor de gran importancia y debe ser realizada a conciencia, puesto que es este proceso donde tiene lugar la extracción de los analitos desde la matriz hacia el soporte sólido.

En una segunda etapa se procede al llenado de la jeringa donde tendrá lugar, por un lado la limpieza de la muestra y, por otro la elución de los analitos. Para ello, debe situarse una frita de polietileno de 20 μm en la parte final de la jeringa con el fin de retener las partículas sólidas que pueden salir al mismo tiempo que se eluyen los analitos. A continuación, se sitúa una primera capa de sulfato sódico anhidro, aproximadamente 1 g, para deshidratar el extracto. En un nivel superior se introducen 4 g de sílice empleada como agente adsorbente, con la función de limpiar el extracto, en particular mediante la retención de lípidos contenidos en la matriz de la muestra. Como último nivel (el superior), se sitúa la muestra homogeneizada con el soporte sólido adicionando sobre su superficie 20 ng g^{-1} de ISs, dejándolo penetrar durante al menos 15 min. En la jeringa debe situarse una segunda frita que cubra todo lo anterior, evitando así la dispersión de las partículas una vez adicionado el disolvente orgánico de elución. Seguidamente, se procede a la elución de los analitos mediante la adición de 20 mL de acetonitrilo. Tras recoger el eluato que contiene los compuestos de interés se evapora en el Turbo-Vap bajo una corriente de N_2 hasta alcanzar un volumen aproximado de 1 mL realizando los lavados intermedios con metanol. A continuación, se sitúan en tubos de vidrio graduados y se llevan hasta 0,5 mL en el Mini-Vap.

Finalmente, los extractos se hacen pasar a través de un filtro de jeringa de 0,2 μm para eliminar las partículas generadas durante la etapa de concentración. Se recoge el volumen final en un vial de 2 mL y se conserva hasta su posterior inyección en el sistema de separación y detección.

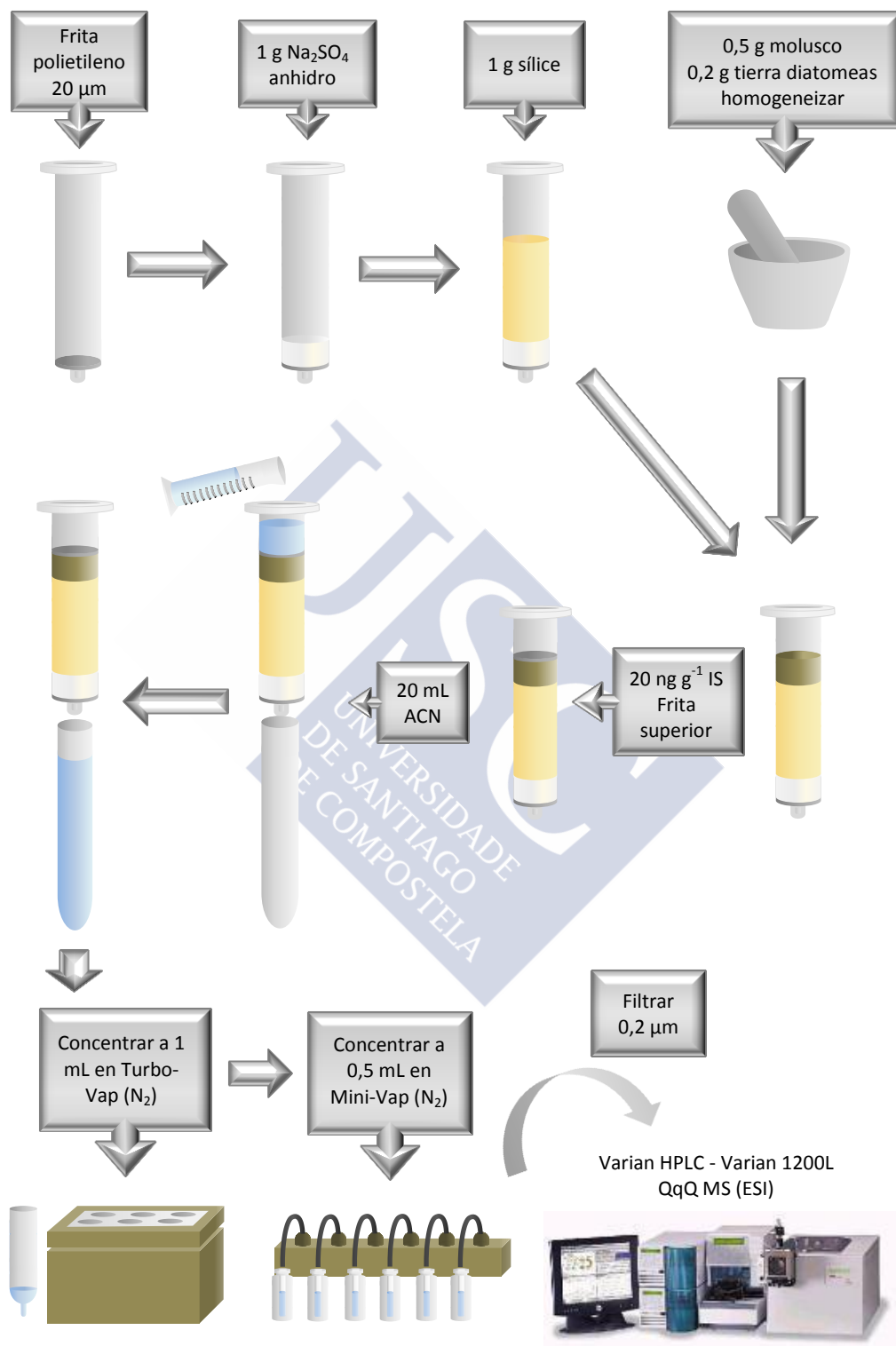


Figura III.6. Esquema optimizado de la extracción de PFASs en moluscos mediante MSPD.

3.6 EXTRACCIÓN DE RETARDANTES DE LLAMA MEDIANTE EXTRACCIÓN CON ABSORBENTES POLIMÉRICOS DE BAJO COSTE

En este estudio no se realizará ninguna etapa de filtración o centrifugación de las muestras acuosas, puesto que como se explicará posteriormente en la Sección IV.2.6.2 origina pérdidas importantes de los analitos antes de poder comenzar el procedimiento.

La extracción de los analitos se realiza utilizando barras de PDMS de 1 cm de longitud preparadas en el laboratorio mediante un sencillo corte con un bisturí. A continuación, se realiza un doble lavado con fracciones limpias de metanol conservando las porciones del polímero como mínimo durante un día en el mismo disolvente y secándolas con toallitas libres de pelusas antes de su utilización.

En la Figura III.7 se presenta de forma esquemática un resumen del protocolo de preparación de muestra, tras optimizar los diferentes parámetros que afectan a la etapa de extracción y desorción de los compuestos de interés. Inicialmente, se realiza una primera etapa donde tendrá lugar la extracción de los analitos. Para ello, se introducen en un vial de vidrio transparente 100 mL de muestra con un 40 % de metanol y un 4 % de NaCl (excepto en muestras de mar y ría), 100 ng L^{-1} de ISS, junto con una barra de agitación magnética y una barra de PDMS; manteniéndolo bajo agitación magnética (500 rpm) a temperatura ambiente durante la noche (15 horas).

Una vez finalizado el proceso de extracción, se dará paso a la segunda etapa de esta técnica donde se procede a la desorción de los analitos retenidos en el material polimérico. Para ello, se retira la fibra del interior del vial con ayuda de unas pinzas limpias y se realiza un lavado con agua Milli-Q. Se seca el material polimérico con toallitas libres de pelusas y se sitúa en el interior de un inserto de 400 μL emplazado en un vial de vidrio de 2 mL con tapa de rosca. La desorción con disolvente se realiza mediante la adición de 300 μL de acetato de etilo en el inserto, manteniéndolo en un baño de ultrasonidos durante 15 min. Al finalizar el período de desorción, se retira la barra de PDMS del inserto y el disolvente orgánico que contiene a los analitos de interés se evapora a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno, reconstituyéndolo finalmente con 50 μL de isooctano. Los extractos permanecerán en el congelador hasta su posterior inyección en el sistema GC-(NCI)-MS(Q).

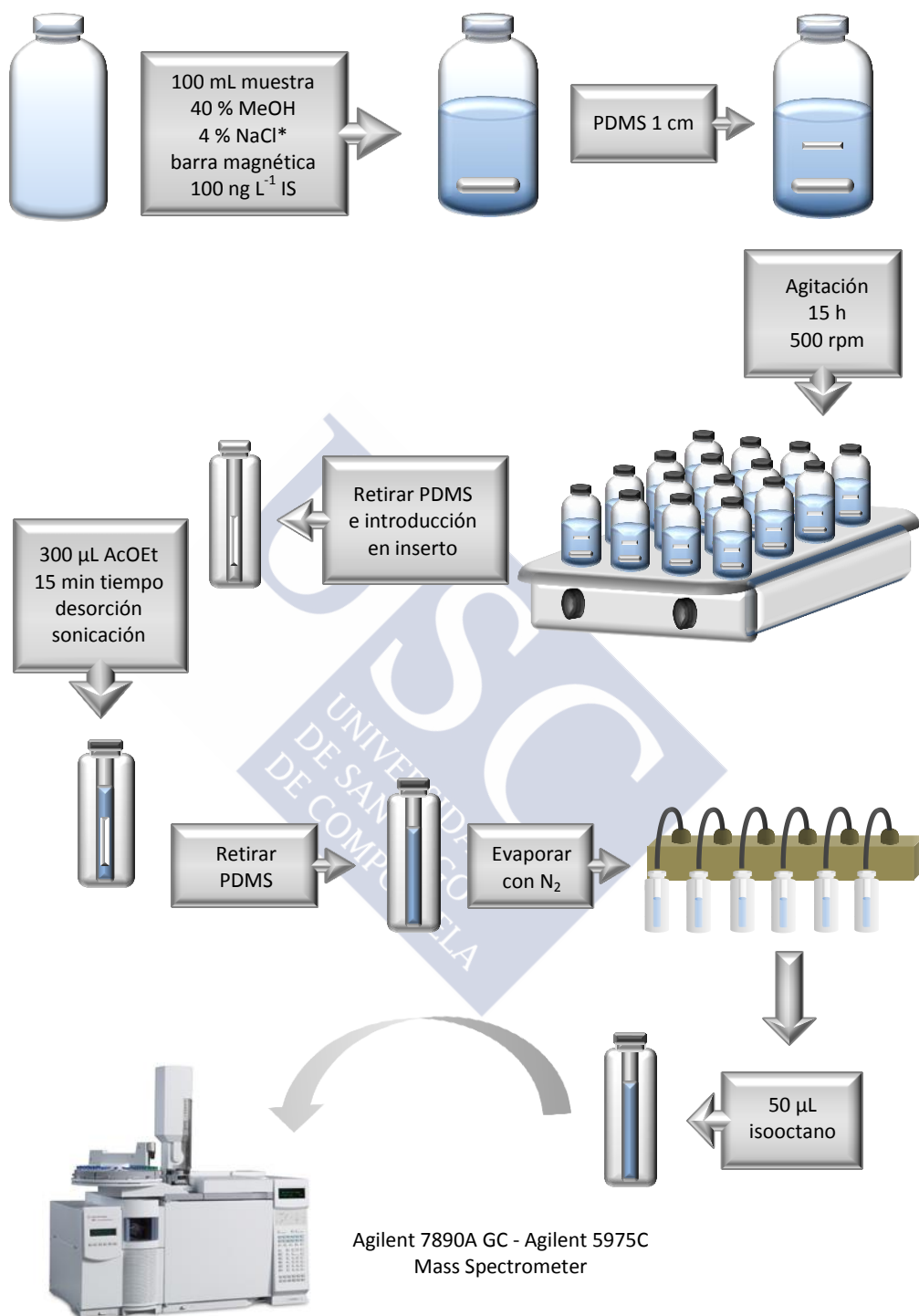


Figura III.7. Esquema optimizado de la extracción de FRs en aguas mediante extracción con absorbentes poliméricos de bajo coste (*Adición en muestra, excepto ría y mar).

3.7 EXTRACCIÓN DE RETARDANTES DE LLAMA MEDIANTE MSPD

Antes de comenzar el protocolo es necesario preparar los adsorbentes a emplear en este estudio: sílice acidificada y Florisil con un control del porcentaje de agua que contiene en su interior, la combinación de ambos logra una retención satisfactoria de los lípidos de la muestra a analizar. La preparación de ambos materiales comienza con la activación de los mismos, tras mantenerse en una estufa durante toda la noche a 130 °C, seguida de una desactivación controlada; con la adición de un 10 % de H₂SO₄ (w/w) y un 5 % de agua Milli-Q (w/w) sobre la sílice y el Florisil, respectivamente. Ambos materiales se someten a una agitación vigorosa para su correcta homogeneización y se conservan en un desecador a temperatura ambiente hasta su posterior uso, evitando así la modificación de las condiciones fijadas.

La Figura III.8 recoge a modo resumen un esquema del procedimiento de preparación de muestra una vez optimizados los diferentes parámetros que pueden afectar a la etapa de extracción. Inicialmente, tiene lugar la etapa de extracción de los analitos desde la matriz por medio de la homogeneización completa en un mortero de vidrio de la muestra de molusco liofilizado junto con el PSA empleado como soporte sólido, tomando 0,5 g de cada uno de ellos. Para proceder al llenado del cartucho donde tendrá lugar de forma simultánea la limpieza de la matriz y la elución de los analitos de interés, se coloca en un primer lugar, una frita de polietileno de 20 µm en la parte inferior de la jeringa con el objetivo de retener las partículas sólidas que puedan salir al mismo tiempo que la elución de los analitos. En un segundo nivel, se sitúan 0,5 g de sílice para lograr la retención de las posibles trazas de sulfúrico provenientes del material adsorbente empleado en este estudio. A continuación, se introduce como material adsorbente, primero 1,75 g de sílice acidificada (10 % (w/w) H₂SO₄) seguido de 1,75 g de Florisil desactivado (5 % (w/w) agua Milli-Q). Sobre este último, se emplaza la mezcla homogeneizada previamente en el mortero, adicionando sobre su superficie 80 ng g⁻¹ de ISs dejándolo penetrar durante al menos 15 min. Todo lo anterior se cubre con una segunda frita para evitar la dispersión de las partículas una vez adicionado el disolvente de elución. Posteriormente, se procede a la elución de los analitos haciendo pasar a través del cartucho 10 mL de diclorometano y a la concentración hasta sequedad del eluato bajo corriente de N₂, empleando para ello el Turbo-Vap (hasta ~0,5 mL) seguido del Mini-Vap realizando los correspondientes lavados con fracciones limpias de diclorometano. Finalmente, se reconstituye el extracto con 200 µL de isooctano quedando listo para su inyección en el sistema GC-(NCI)-MS(Q).

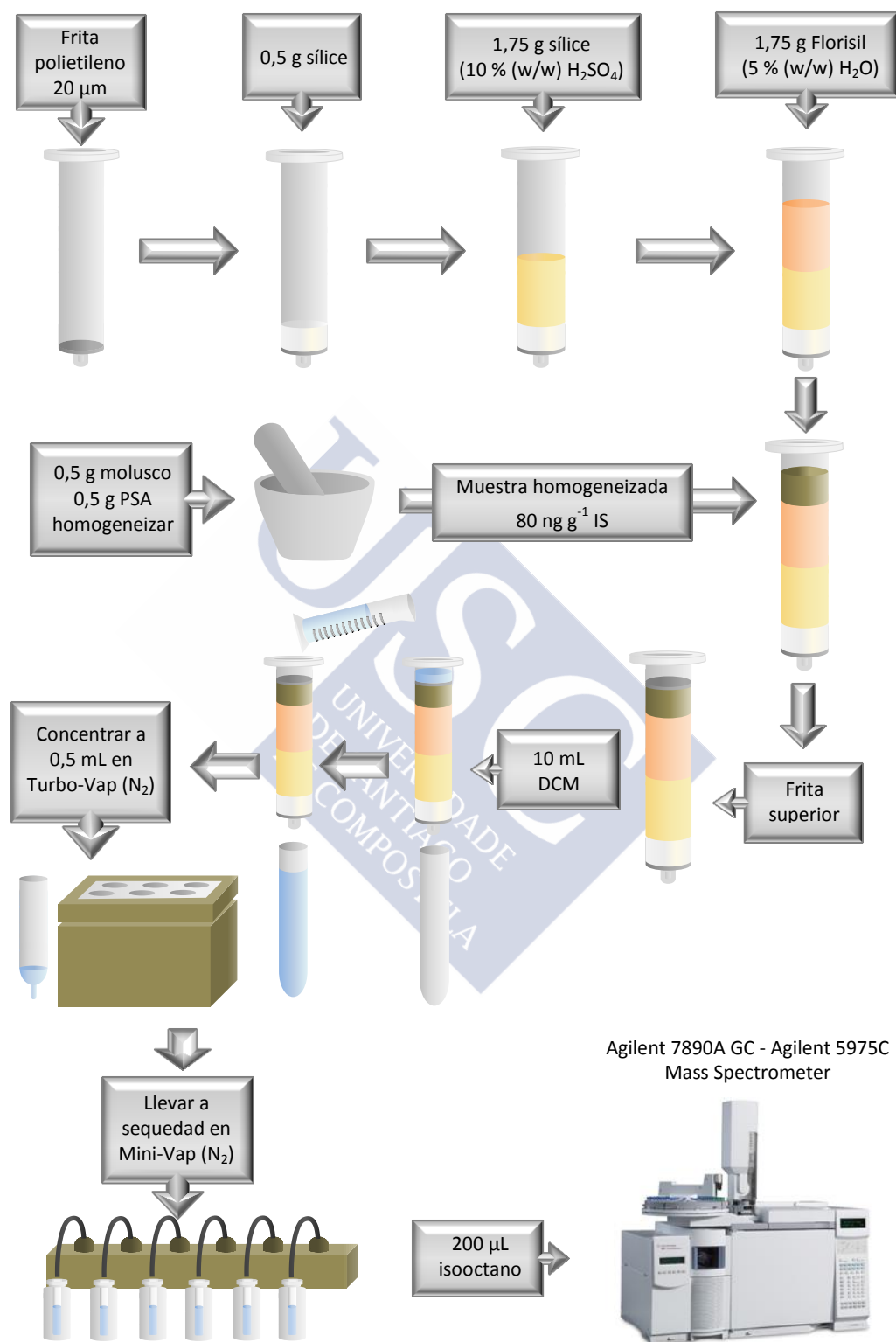


Figura III.8. Esquema optimizado de la extracción de FRs en moluscos mediante MSPD.





IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



1. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

Con la finalidad de lograr un correcto desarrollo de una nueva metodología analítica es necesario seguir una serie de etapas. Inicialmente, se realizó la validación del sistema de separación y detección a emplear, seguido por la optimización de la técnica de extracción y la validación de la misma, para finalizar con la aplicación a las muestras reales determinando así las concentraciones de analitos presentes en las mismas.

Para ello, la propuesta de la normativa SANTE 11945/2015 [736] (anteriormente SANCO 12571/2013 [735]) establece unas pautas a seguir para lograr la correcta validación de sistema analítico, entendiéndose como validación la *“confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de uso específico previsto”*. La validación se realiza mediante el estudio de diversos parámetros como la exactitud (mediante el estudio de la recuperación (uso de materiales de referencia o comparación con métodos de referencia)), la precisión (estudio de la repetibilidad), el estudio de la linealidad y rango de trabajo, y de la determinación de los LODs y LOQs.

Los LODs y LOQ pueden ser estimados de diferentes formas; sin embargo, a lo largo de esta Tesis Doctoral se emplean dos modos diferentes:

- mediante la relación S/N, quedando definido el LOD como 3 veces la relación S/N ($LOD = 3 \cdot S/N$) y el LOQ como 10 veces la S/N ($LOQ = 10 \cdot S/N$). S/N calculada en base a un patrón de nivel bajo del calibrado.
- basándose en los blancos de extracción, quedando definido el LOD como 3 veces la desviación estándar del blanco (SD) ($LOD = 3 \cdot SD$) y LOQ como 10 veces la SD del blanco ($LOQ = 10 \cdot SD$).

1.1 PARABENES MEDIANTE LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)

1.1.1 Cromatogramas

En la Figura IV.1 se presenta un cromatograma correspondiente a un patrón de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, inyectado bajo condiciones óptimas de elución de la columna, donde se aprecia claramente picos caracterizados por su gran simetría y por ausencia de colas.

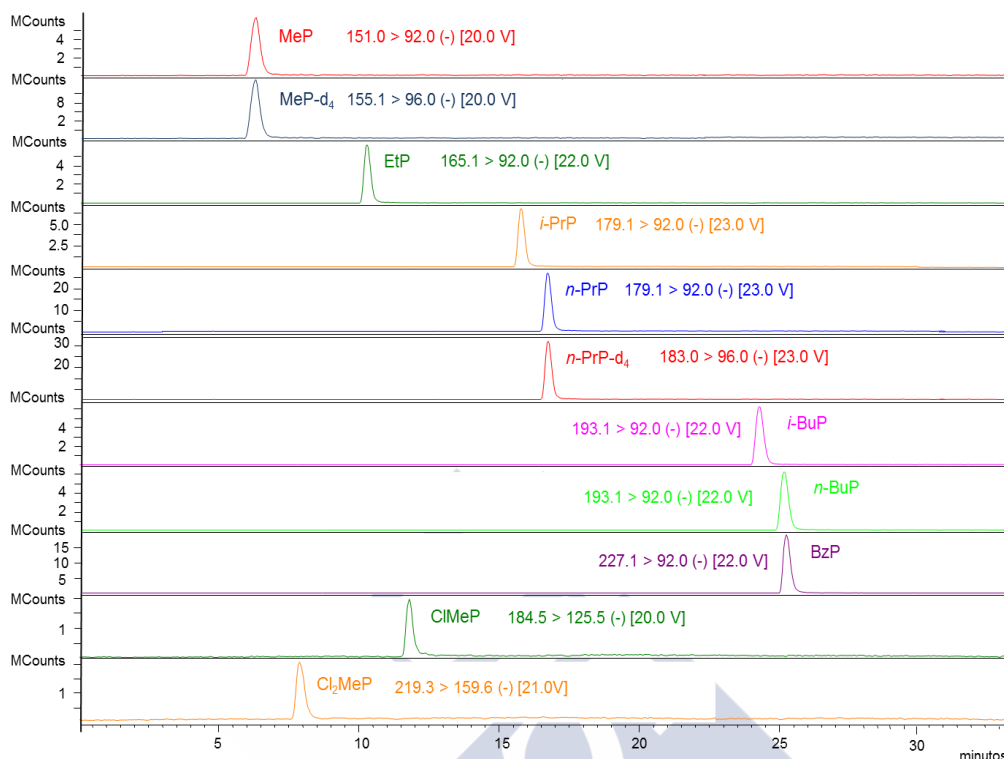


Figura IV.1. Cromatograma de un patrón de 500 µg L⁻¹ de parabenes y sus correspondientes ISs, inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección (condiciones recogidas en la Sección III.2.1.2).

1.1.2 Linealidad

La linealidad de la respuesta analítica se evalúa mediante la inyección de diez disoluciones con la mezcla de todos los analitos en metanol, a niveles de concentración de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 y 100 µg L⁻¹ y con adición de los ISs a nivel de 50 µg L⁻¹. La evaluación de la linealidad de la respuesta se efectúa mediante el método de calibración interna.

La linealidad se evalúa en función del coeficiente de determinación (R^2) obtenido para cada analito. En la Tabla IV.1 se presentan los diferentes parámetros característicos en el estudio de la linealidad de la respuesta analítica: ecuaciones de la recta y R^2 para las transiciones más intensas de cada analito. Mediante el método del patrón externo se obtienen R^2 superiores a 0,960. Sin embargo, al realizar las correcciones con los ISs deuterados (MeP d₄ y n-PrP d₄) se logran valores de R^2 bastante superiores para todos los analitos ($R^2 > 0,999$), lo que implica una gran linealidad en la respuesta analítica.

Tabla IV.1. Parámetros de las rectas de calibrado, repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de parabenos (corrección con ISs) obtenidos mediante el sistema LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).

COMPUESTO	IS	CALIBRADO CON PATRÓN INTERNO	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			10 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$		
MeP	MeP d ₄	$y=0,0208x-0,0018$ $R^2: 0,9999$	7,2	3,4	0,19	0,63
Cl ₂ MeP	MeP d ₄	$y=0,0087x+0,0088$ $R^2: 0,9991$	7,7	3,2	0,09	0,29
EtP	n-PrP d ₄	$y=0,0146x-0,0021$ $R^2: 0,9998$	5,8	2,1	0,15	0,50
ClMeP	n-PrP d ₄	$y=0,0021x-0,0001$ $R^2: 0,9992$	7,3	4,5	0,29	0,96
i-PrP	n-PrP d ₄	$y=0,0171x-0,0027$ $R^2: 0,9997$	3,3	2,8	0,30	1,00
n-PrP	n-PrP d ₄	$y=0,0203x+0,0003$ $R^2: 0,9999$	5,6	4,3	0,15	0,50
i-BuP	n-PrP d ₄	$y=0,0242x+0,0040$ $R^2: 0,9999$	5,0	3,2	0,09	0,29
n-BuP	n-PrP d ₄	$y=0,0215x+0,0096$ $R^2: 0,9997$	3,4	2,0	0,10	0,33
BzP	n-PrP d ₄	$y=0,0285x+0,0096$ $R^2: 0,9997$	6,5	2,8	0,12	0,40

1.1.3 Precisión

La precisión del sistema se evaluó por medio de un estudio de repetibilidad, expresada como la desviación estándar relativa (RSD, %), mediante la inyección continuada ($n=8$) de dos patrones de concentración 10 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos y con 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los ISs.

En la Tabla IV.1 se recogen los resultados de las RSD (%) obtenidos para los dos niveles de concentración. En base a los niveles límites de RSD considerados por la nueva normativa SANTE 11945/2015 [736], donde se establecen $\text{RSD} \leq 20\%$ para considerar una

precisión satisfactoria, se puede resumir diciendo que el sistema presenta una buena repetibilidad, con valores inferiores al 9,3 % para ambos niveles sin efectuar las correcciones con los correspondientes ISs. Sin embargo, estos valores logran reducirse por debajo del 7,7 % para el nivel de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y del 5,0 % para el de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ cuando se realiza la corrección con los ISs.

1.1.4 LODs, LOQs y blancos instrumentales

Los LODs y LOQs fueron calculados mediante la relación S/N de un patrón de nivel bajo del calibrado (método α en la Sección IV.1) tras la comprobación de ausencia de blancos instrumentales, quedando definidos el LOD y el LOQ como 3 y 10 veces la relación S/N, respectivamente. Los diferentes valores obtenidos en el sistema LC-MS/MS para parabenos se presentan recogidos en la Tabla IV.1.

En base a estos resultados, se puede concluir en que los LODs del método analítico se encuentran comprendidos en un rango desde 0,09 y $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$ y los LOQs entre 0,29 y $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

1.2 ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS MEDIANTE LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)

1.2.1 Cromatogramas

En la Figura IV.2 se presenta un cromatograma correspondiente a un patrón de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ inyectado con las condiciones de separación y detección empleadas en la determinación de PFASs en moluscos mediante MSPD, presentadas anteriormente en la Sección III.2.2. En el cromatograma se aprecian claramente picos caracterizados por su gran simetría y por ausencia de colas. En el caso del PFOS, se caracteriza por la presencia de varios picos debidos a la mezcla de isómeros que lo componen. Por otro lado, en la Figura IV.3 queda representado un cromatograma de un patrón de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para los diferentes analitos marcados isotópicamente tras emplear las mismas condiciones de separación y detección seleccionadas para la Figura IV.2, caracterizado nuevamente por la simetría de sus picos y la ausencia de colas u hombros.

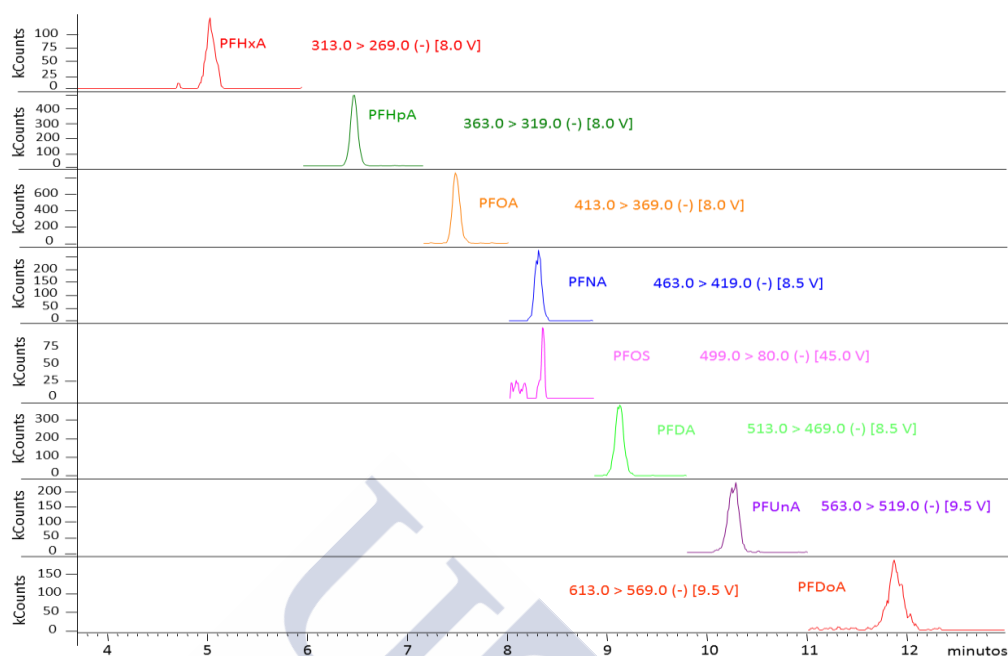


Figura IV.2. Cromatograma de un patrón de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de PFASs inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección fijadas para el método de MSPD (condiciones recogidas en la Sección III.2.2).

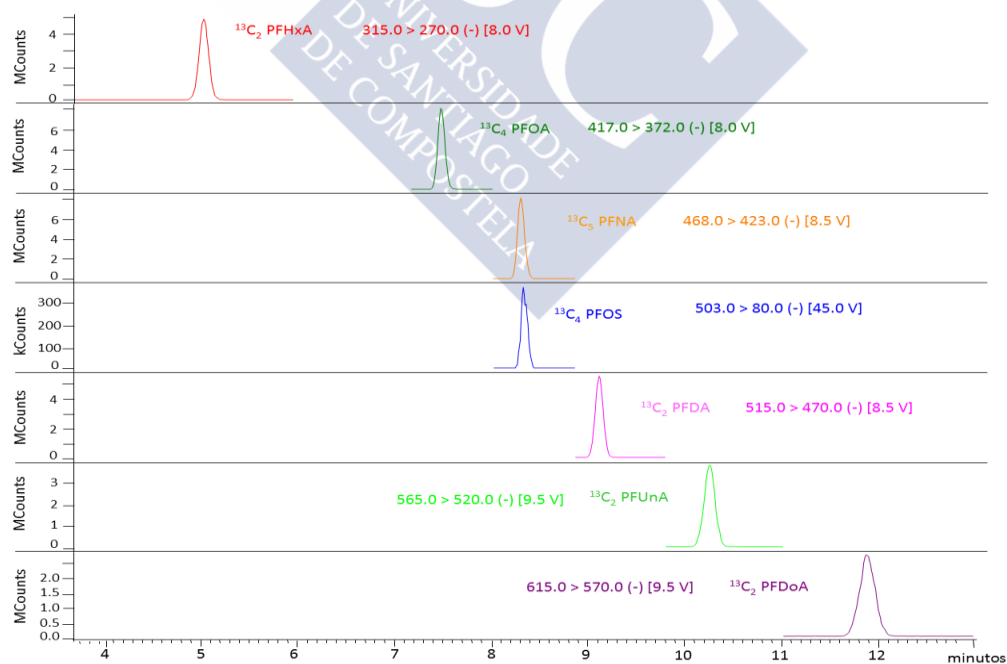


Figura IV.3. Cromatograma de un patrón de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para los analitos marcados isotópicamente inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección fijadas para el método de MSPD (condiciones recogidas en la Sección III.2.2).

1.2.2 Linealidad

La linealidad de la respuesta analítica se evaluó mediante la inyección de diez disoluciones patrón en metanol, con niveles de concentración correspondientes a 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. La calibración se efectuó mediante el método de calibración interna, empleando para ello los correspondientes patrones marcados isotópicamente a un nivel de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Los diferentes parámetros obtenidos para las rectas de calibrado y los coeficientes de determinación de las transiciones más intensas se recogen en la Tabla IV.2. Se obtienen R^2 próximos a 0,99 para todos los analitos a excepción del PFNA mediante el método del patrón externo. Sin embargo, al efectuar las correcciones con los patrones marcados isotópicamente se logran valores de $R^2 > 0,99$ en todos los casos.

Tabla IV.2. Parámetros de las rectas de calibrado (corrección con ISs), repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de los PFASs obtenidos mediante el sistema LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).

COMPUESTO	IS	CALIBRADO CON PATRÓN INTERNO	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
			5 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$		
PFHxA	$^{13}\text{C}_2$ PFHxA	$y=0,014x+0,172$ $R^2: 0,9911$	6,1	6,4	0,08	0,27
PFHpA	$^{13}\text{C}_4$ PFOA	$y=0,030x-0,038$ $R^2: 0,9992$	3,5	4,0	0,06	0,20
PFOA	$^{13}\text{C}_4$ PFOA	$y=0,049x+0,052$ $R^2: 0,9998$	2,8	2,9	0,04	0,14
PFNA	$^{13}\text{C}_5$ PFNA	$y=0,047x+0,128$ $R^2: 0,9972$	2,8	4,1	0,04	0,14
PFDA	$^{13}\text{C}_2$ PFDA	$y=0,025x+0,169$ $R^2: 0,9948$	2,5	4,6	0,05	0,15
PFUnA	$^{13}\text{C}_2$ PFUnA	$y=0,033x+0,185$ $R^2: 0,9976$	7,4	6,8	0,09	0,29
PFDoA	$^{13}\text{C}_2$ PFDoA	$y=0,037x+0,206$ $R^2: 0,9976$	7,3	5,7	0,13	0,45
PFOS	$^{13}\text{C}_4$ PFOS	$y=0,038x-0,102^a$ $R^2: 0,9987^a$	6,9 ^a	3,6 ^a	0,15 ^a 0,05 ^b	0,50 ^a 0,18 ^b

^a Calculados con la transición 499 \rightarrow 99 (empleadas en investigación de extracción con polímeros (PES) y MSPD)

^b Calculados con la *pseudo*-transición 499 \rightarrow 499 (empleada en investigación con SPE)

1.2.3 Precisión

La precisión del sistema LC-MS/MS para los PFASs se evaluó por medio de un estudio de la repetibilidad, expresada como la RSD, mediante la inyección continuada ($n=7$) de dos patrones de concentración 5 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos.

En la Tabla IV.2 se recogen los resultados de las RSD (%) obtenidos para los dos niveles de concentración. Los resultados obtenidos de las RSDs se consideran satisfactorios en base a lo establecido en la nueva normativa SANTE 11945/2015 [736], con valores comprendidos entre 2,5 y 7,4 % para el nivel de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ y en un rango comprendido entre 2,9 y 6,8 % para el patrón de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

1.2.4 LODs, LOQs y blancos instrumentales

Uno de los principales problemas registrados en la bibliografía con estos analitos está asociado con la contaminación de fondo, por tanto se evaluaron blancos instrumentales mediante inyecciones de metanol en diferentes viales de inyección, descartando así la presencia de los mismos tras no haber sido detectados en los blancos. Por tanto, los LODs y LOQs instrumentales se volvieron a calcular como 3 o 10 veces la relación S/N, respectivamente, empleando la primera transición del estándar de menor concentración del calibrado (método α en la Sección IV.1). Los diferentes valores obtenidos en el sistema LC-MS/MS para los PFASs se presentan recogidos en la Tabla IV.2.

Se aprecia claramente una notable mejora de los LODs y LOQs del PFOS originada por el cambio de transiciones a la hora de efectuar la cuantificación de nuestro analito con el equipo. La *pseudo*-transición (499 \rightarrow 499) utilizada origina un aumento de la intensidad del pico en el sistema y tiene como consecuencia un aumento de la relación S/N y por tanto, la disminución de LODs necesaria para cumplir los requisitos establecidos por la EU [266]. No obstante, por cuestión cronológica este cambio en las transiciones del PFOS sólo se pudo realizar en la investigación PFASs mediante SPE.

En base a estos resultados, se puede concluir en que los LODs del método analítico se encuentran comprendidos en un rango desde 0,04 (PFOA y PFNA) hasta 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PFOS con transición 499 \rightarrow 99), y los LOQs desde 0,14 hasta 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

1.3 RETARDANTES DE LLAMA MEDIANTE GC-(NCI)-MS(Q)

Teniendo en mente las referencias encontradas a lo largo de la bibliografía [538,739,740] en cuanto al modo de ionización a utilizar con estos compuestos, ya sea EI como CI, se decide realizar un estudio comparativo entre ambos modos de trabajo a lo largo de todo el estudio de la validación del sistema de separación y detección de los FRs. Conociendo la facilidad que presentan los HFRs para la formación de iones negativos tras la ionización de la molécula, es de esperar que entre los dos modos de trabajo en CI, NCI y PCI, sea la primera de ellas la que ofrezca mejores resultados. Por tanto el estudio se realiza únicamente comparando EI frente NCI.

1.3.1 Cromatogramas

Las primeras conclusiones se pueden obtener observando los cromatogramas recogidos en la Figura IV.4 y la Figura IV.5 obtenidos para un patrón de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de estos compuestos inyectados mediante NCI e EI, respectivamente. Como se puede observar tras comparar la señal proporcionada por ambos modos de ionización, NCI genera niveles notablemente superiores lo que implica una mayor sensibilidad del sistema, correspondiendo con lo encontrado en la bibliografía. En algunos casos, como para los analitos más ligeros la señal generada mediante EI es casi 100 veces inferior a la proporcionada empleando NCI, siendo esta diferencia más notable para los analitos de mayor tamaño, como el BDE-209, TTBP o e DBDPE.

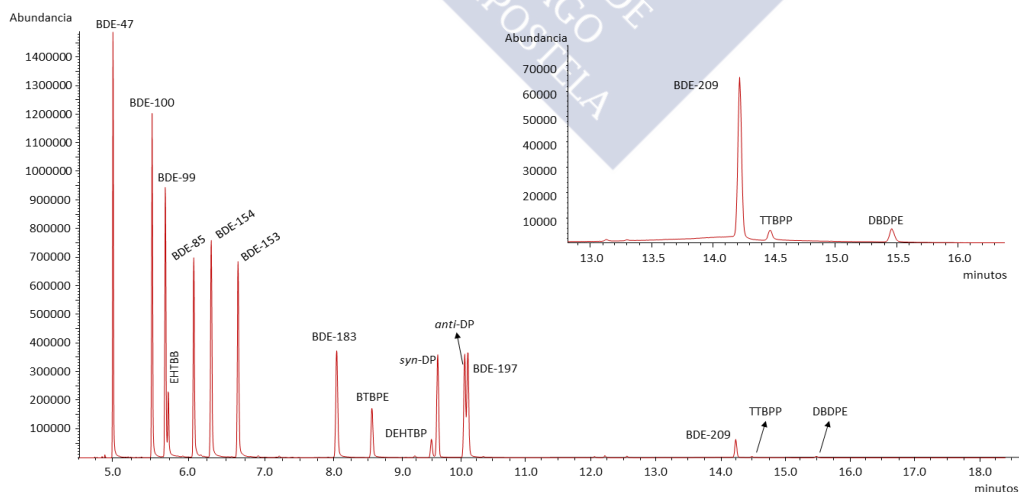


Figura IV.4. Cromatograma de un patrón de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de FRs inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección (condiciones recogidas en la Sección III.2.3) empleando NCI como modo de ionización.

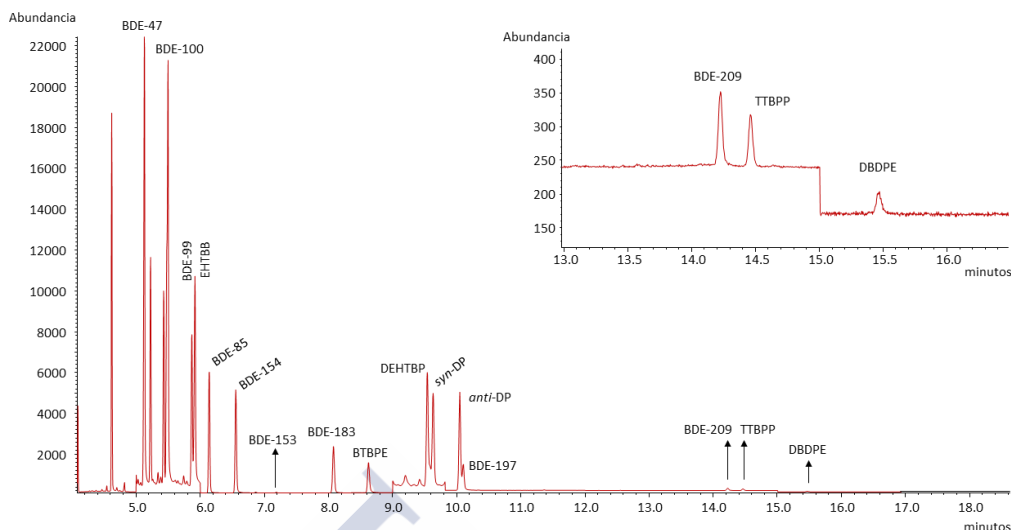


Figura IV.5. Cromatograma de un patrón de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de FRs inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección (condiciones recogidas en la Sección III.2.3) empleando EI como modo de ionización.

1.3.2 Linealidad

Se estudiaron también las curvas de calibración para los FRs empleando los dos modos de ionización seleccionados anteriormente: NCI e EI. Para ello se inyectan en el sistema diez patrones con la mezcla de todos los analitos a distintos niveles: 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$. La Tabla IV.3 recoge los diferentes resultados obtenidos mediante el método de calibración externa empleando NCI como modo de ionización y la Tabla IV.4 empleando EI.

Tal y como se puede ver en la Tabla IV.4 los valores de R^2 obtenidos mediante EI son superiores a 0,9410; sin embargo, se logran respuestas más lineales al emplear la NCI como método de ionización de la muestra, con $R^2 > 0,9916$ (Tabla IV.3).

1.3.3 Precisión

La precisión del sistema se evaluó de nuevo con finalidad comparativa entre los dos tipos de modos de ionización para el GC-MS, mediante el estudio de las repetibilidades, expresadas mediante las RSDs correspondientes. Para ello, se inyectaron inicialmente seis réplicas de 50 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de disoluciones con mezcla de los diferentes FRs empleando EI como fuente de ionización. Por otro lado se decidió efectuar este estudio a niveles más

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bajos, mediante la inyección de seis réplicas de 2,5 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ empleando NCI como fuente de ionización.

Tabla IV.3. Parámetros de las rectas de calibrado, repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de los FRs obtenidos mediante el sistema GC-(NCI)-MS(Q).

COMPUESTO	CALIBRADO CON PATRÓN EXTERNO	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
		2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	25 $\mu\text{g L}^{-1}$		
BDE-47	$y=19221,9x+110304,6$ $R^2: 0,9920$	5,2	3,5	0,01	0,05
BDE-100	$y=20590,1x+107452,1$ $R^2: 0,9931$	5,6	4,9	0,01	0,03
BDE-99	$y=18548,8x+81502,7$ $R^2: 0,9916$	4,0	3,6	0,01	0,05
EHTBB	$y=5364,8x+12882,8$ $R^2: 0,9934$	5,8	2,6	0,17	0,55
BDE-85	$y=15848,0x+56340,2$ $R^2: 0,9934$	4,1	3,9	0,02	0,08
BDE-154	$y=19729,9x+72649,6$ $R^2: 0,9938$	5,5	3,1	0,03	0,09
BDE-153	$y=12541,2x+54224,9$ $R^2: 0,9954$	4,1	1,6	0,03	0,09
BDE-183	$y=12541,2x+56928,7$ $R^2: 0,9923$	4,5	1,9	0,05	0,17
BTBPE	$y=6384,2x+20063,3$ $R^2: 0,9946$	3,0	2,8	0,09	0,29
DEHTBP	$y=2288,3x+8817,0$ $R^2: 0,9920$	5,6	3,6	0,08	0,27
syn-DP	$y=9343,3x+45854,1$ $R^2: 0,9920$	4,9	4,4	0,008	0,03
anti-DP	$y=9187,4x+45449,4$ $R^2: 0,9924$	3,1	1,4	0,01	0,03
BDE-197	$y=12200,6x+38155,4$ $R^2: 0,9932$	3,4	2,6	0,02	0,08
BDE-209	$y=2532,9x-7401,2$ $R^2: 0,9953$	8,4	7,5	0,17	0,57
TTBPP*	$y=215,0x-2328,5$ $R^2: 0,9988$	-	14,0	1,41	4,70
DBDPE	$y=291,1x-1641,7$ $R^2: 0,9931$	-	11,3	1,58	5,27

* Determinado únicamente para las muestras de aguas.

Tabla IV.4. Parámetros de las rectas de calibrado, repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de los FRs obtenidos mediante el sistema GC-(EI)-MS(Q).

COMPUESTO	CALIBRADO CON PATRÓN EXTERNO	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
		50 $\mu\text{g L}^{-1}$	500 $\mu\text{g L}^{-1}$		
BDE-47	$y=137,2x+1437,9$ $R^2: 0,9595$	11,1	7,3	1,9	6,2
BDE-100	$y=87,0x+695,5$ $R^2: 0,9671$	9,3	7,6	1,0	3,4
BDE-99	$y=93,2x+758,1$ $R^2: 0,9629$	9,3	7,8	0,8	2,8
EHTBB	$y=1552,0x+122068,8$ $R^2: 0,9410$	10,2	6,4	3,8	12,7
BDE-85	$y=84,3x+515,5$ $R^2: 0,9690$	10,0	7,8	4,3	14,4
BDE-154	$y=80,5x+588,4$ $R^2: 0,9664$	9,4	7,9	0,6	2,0
BDE-153	$y=80,5x+554,8$ $R^2: 0,9659$	9,8	8,6	0,7	2,4
BDE-183	$y=40,9x+275,6$ $R^2: 0,9650$	8,9	8,9	1,7	6,2
BTBPE	$y=31,8x+289,5$ $R^2: 0,9550$	10,6	10,8	9,0	30,0
DEHTBP	$y=41,2x+32,3$ $R^2: 0,9642$	-	10,9	35,4	117,9
syn-DP	$y=86,7x+596,1$ $R^2: 0,9662$	8,8	8,8	1,8	5,9
anti-DP	$y=86,8x+604,9$ $R^2: 0,9660$	7,0	9,1	1,7	5,6
BDE-197	$y=22,7x+116,0$ $R^2: 0,9563$	9,2	10,2	3,7	12,4
BDE-209	$y=2,0x-7,8$ $R^2: 0,9573$	-	17,6	58,2	193,9
TTBPP*	$y=1,7x-12,5$ $R^2: 0,9777$	-	17,0	32,0	106,8
DBDPE	$y=0,9x-20,1$ $R^2: 0,9552$	-	13,9	67,9	226,2

* Determinado únicamente para las muestras de aguas.

De acuerdo con lo esperado y según lo recogido en la Tabla IV.3 y la Tabla IV.4, se obtienen peores resultados empleando EI como fuente de ionización, incluso analizando

niveles de concentración notablemente superiores, con RSDs próximos a un 11 y un 18 % para 50 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, se logran resultados más reproducibles empleando NCI, presentando valores de RSDs notablemente inferiores para todos los analitos, siendo de aproximadamente un 8 y un 14 % para 2,5 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Los analitos más pesados, como son el BDE-209, DEHTBP, TTBPP y el DBDPE, no logran ser detectados con EI a niveles inferiores a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

1.3.4 LODs, LOQs y blancos instrumentales

Los LODs y LOQs se calcularon mediante la relación S/N de un patrón de nivel bajo del calibrado (método α en la Sección IV.1). Los diferentes valores obtenidos en el sistema GC-MS para los FRs correspondientes a NCI e EI se presentan recogidos en la Tabla IV.3 y Tabla IV.4, respectivamente.

Como era de esperar en base a referencias encontradas en la bibliografía [740,741], y de acuerdo con lo presentado en los cromatogramas de la Figura IV.4 y Figura IV.5, EI conlleva una reducción de la sensibilidad del equipo para los compuestos estudiados, presentando LODs y LOQs comprendidos entre 0,6 y 67,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 2,0 y 226,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. El modo de ionización NCI, sin embargo, permite disminuir los LODs y LOQs del sistema proporcionando por tanto una mayor sensibilidad, principalmente generada por la señal de elevada intensidad generada en el equipo originada por los átomos halogenados de bromo. En este caso, para NCI, se logran LODs en un rango de 0,008 y 1,58 $\mu\text{g L}^{-1}$, y LOQs entre 0,03 y 5,27 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Con base en los diferentes resultados presentados a lo largo de los anteriores estudios de validación del sistema de GC-MS(Q), se selecciona NCI como modo de ionización de los FRs.

2. DESARROLLO METODOLÓGICO

2.1 DETERMINACIÓN DE PARABENES Y TRICLOSÁN EN AGUAS MEDIANTE MASE

2.1.1 Introducción y objetivos

Este primer trabajo recogido en la presente memoria tiene como principal objetivo el desarrollo de un método analítico que permite detectar de forma simultánea siete parabenos y el triclosán en muestras de agua, tanto en muestras de aguas residuales como superficiales. Se emplea como método de preparación de muestra MASE, también conocida como MALLE, basándose en la gran variedad de ventajas que presenta frente a otros métodos de extracción. Tiene especial interés porque implica el uso de menores volúmenes de disolventes orgánicos, presenta mayor selectividad obteniéndose así extractos más limpios y se trata de una técnica con un sistema de montaje sencillo y fácilmente automatizable.

Finalmente, la determinación se realizó mediante GC-(EI)-MS/MS(IT), ya que se trata de una técnica que proporciona elevados niveles de sensibilidad y selectividad, permitiendo también la identificación inequívoca de todos los contaminantes analizados. La baja volatilidad de dichos compuestos y la elevada polaridad hacen necesario realizar previamente una reacción de derivatización para mejorar su determinación mediante GC.

El presente trabajo tiene como principales objetivos:

- ✓ Optimización de las condiciones de extracción mediante MASE: elección del disolvente de extracción óptimo, selección del derivatizante, selección de los posibles tampones, optimización mediante un diseño experimental y evaluación de la cinética de extracción.
- ✓ Validación del método: efectos de matriz, linealidad, eficacia de extracción, exactitud, precisión, LODs y LOQs.
- ✓ Aplicación a muestras reales: agua de ríos y efluentes e influentes de WWTP.

2.1.2 Optimización de la técnica de extracción

Experimentos previos: condiciones de derivatización y extracción

Para poder realizar los procesos de separación y determinación de los analitos del estudio mediante GC-MS es necesaria una etapa de derivatización previa a la inyección de la muestra en el sistema, con la finalidad de reducir la polaridad e incrementar la volatilidad de estos compuestos fenólicos. Entre las diferentes opciones encontradas en la bibliografía, se consideraron procedimientos de derivatización posteriores a la etapa de extracción, como reacciones de alquilación (ej. diazometano [172,510] o PFBBR [199]) y reacciones de sililación (ej. BSTFA [150,562] o MTBSTFA [50,174]). Sin embargo, hay otras opciones como derivatización previa a la etapa de extracción por medio de reacciones de acilación *in situ* que podrían incrementar la capacidad extractiva de los analitos; ello implica la adición del reactivo derivatizante (ej. Ac_2O [160] o *i*BCF [561]) directamente sobre la muestra.

Entre las diversas opciones nombradas anteriormente, se seleccionaron y evaluaron tres de los anteriores derivatizantes para el desarrollo de esta nueva metodología. Por un lado, el MTBSTFA como reactivo sililante para una derivatización posterior a la extracción, y el Ac_2O y el *i*BCF, como agentes derivatizantes simultáneamente a la extracción. La Figura IV.6 recoge las diferentes estructuras de los derivatizantes empleados en este estudio.

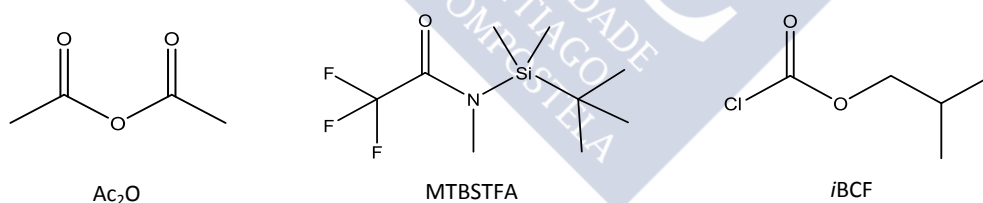


Figura IV.6. Estructuras de los agentes derivatizantes empleados en el estudio.

En la Figura IV.7 se presentan los diferentes cromatogramas obtenidos de iones extraídos de los compuestos sin derivatizar y tras ser derivatizados con los agentes mencionados anteriormente. En el cromatograma de los analitos sin derivatizar (Fig. IV.7.a) se pueden apreciar picos con escasa simetría y con grandes colas. Sin embargo, en general y tal y como se confirma en la Figura IV.7 b, c y d, los compuestos derivatizados producen picos con gran simetría y sin colas.

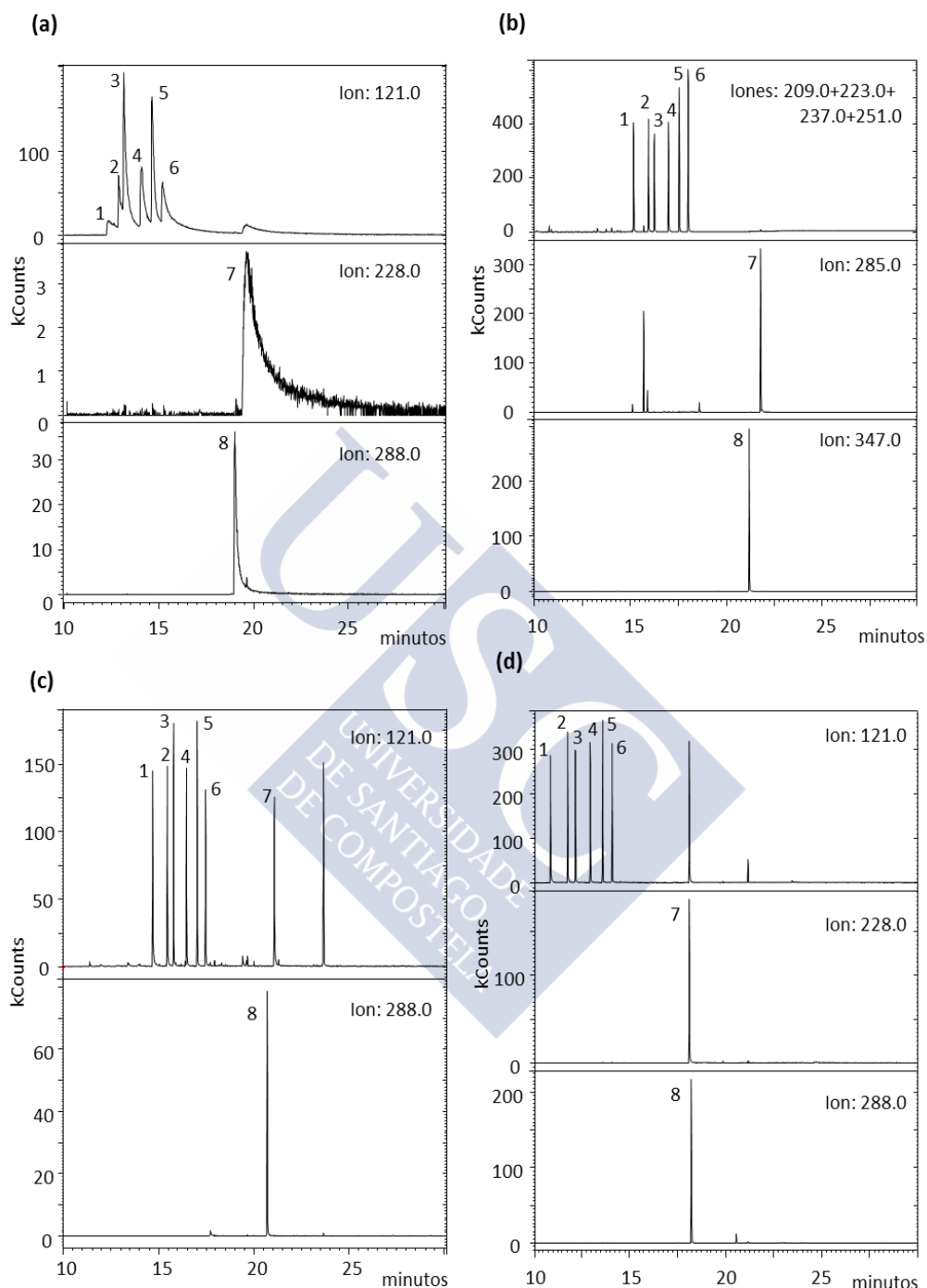


Figura IV.7. Cromatograma de iones extraídos: a) de los analitos sin derivatizar, y de los analitos derivatizados utilizando b) MTBSTFA, c) IBCF y d) Ac_2O . Identificación de compuestos: 1. MeP, 2. EtP, 3. *i*-PrP, 4. *n*-PrP, 5. *i*-BuP, 6. *n*-BuP, 7. BzP y 8. TCS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura IV.8 y Figura IV.9 se muestran los diferentes espectros de MS del *n*-PrP (representativo del resto de parabenos) y del triclosán, respectivamente; presentándose como en el caso anterior, sin derivatizar y derivatizado con los diferentes reactivos seleccionados. Como se puede observar en dichas figuras, las reacciones de acilación apenas modifican los espectros de masas de los compuestos estudiados, mientras que la sililación origina un notable incremento en el valor m/z del pico base que se corresponde con la pérdida de un grupo *tert*-butilo por parte del ion molecular $[M-57]^+$.

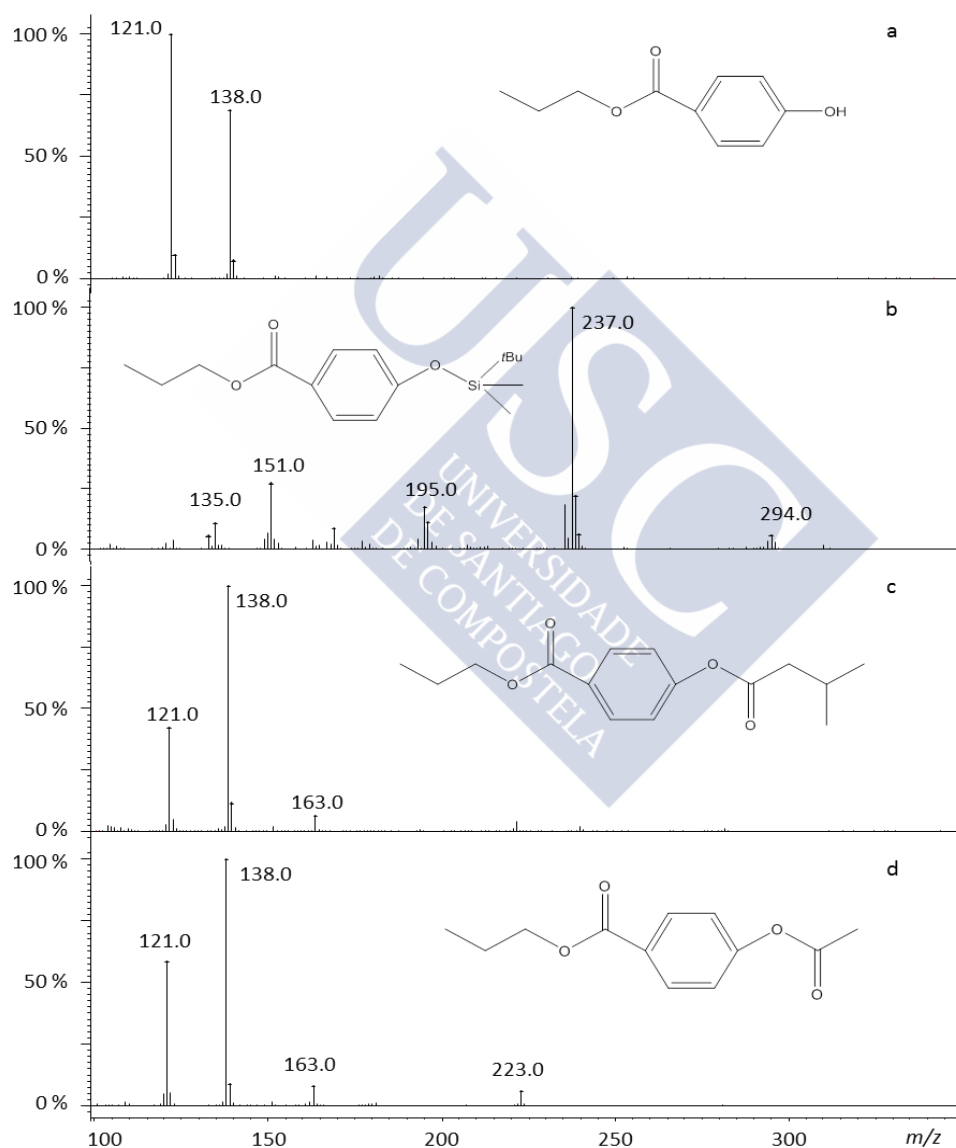


Figura IV.8. Espectros de masas del *n*-PrP: a) sin derivatizar, y derivatizado con b) MTBSTFA, c) *i*BCF y d) Ac_2O .

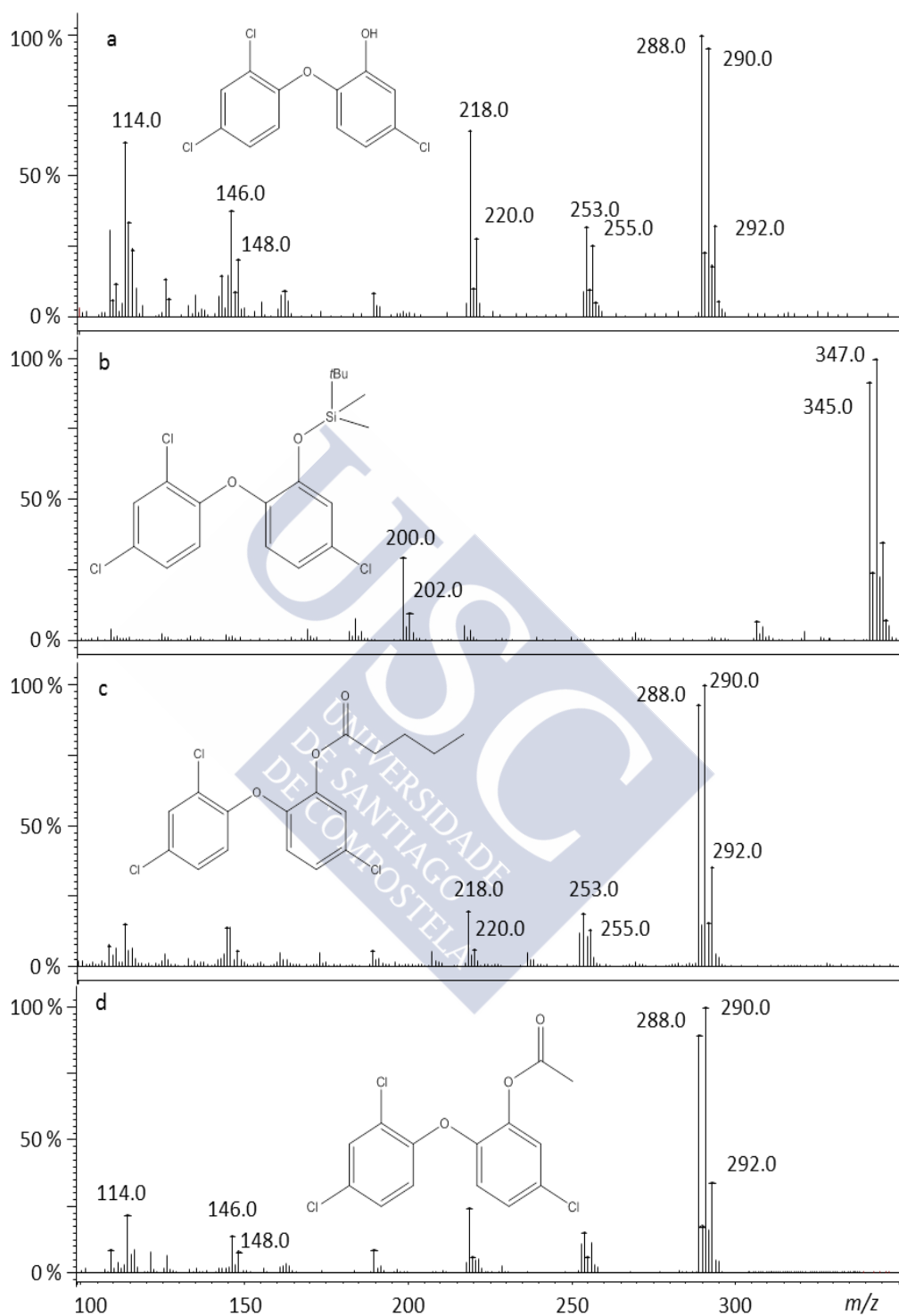


Figura IV.9. Espectros de masas del TCS: a) sin derivatizar, y derivatizado con b) MTBSTFA, c) BCF y d) Ac₂O.

Las condiciones de derivatización y extracción de los analitos de interés se evaluaron simultáneamente (próximas secciones) en base a la influencia que se ejercen, descartando por tanto el estudio individualizado de cada una de ellas.

Selección del disolvente

El primer paso en la optimización de la técnica de extracción consiste en la selección del disolvente más adecuado para la extracción de los analitos de interés. Se evaluaron seis tipos de disolventes orgánicos (ciclohexano, hexano, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo y acetona) que abarcan un amplio rango de polaridades (0 - 5,8) y diferentes niveles de solubilidad en agua (0 - 100 %). Todos ellos fueron estudiados en combinación tanto con derivatización mediante acilación en medio acuoso, como con sililación posterior en medio orgánico. Para este ensayo se efectuaron extracciones por duplicado con cada uno de los disolventes bajo las condiciones presentadas a continuación.

En el caso de derivatización mediante acilación, se emplea un vial de espacio de cabeza de 22 mL de capacidad donde se introdujeron 18 mL de disolución acuosa (agua Milli-Q) conteniendo un 15 % de NaCl (al aumentar la fuerza iónica se disminuye la solubilidad en la fase acuosa favoreciendo la solubilidad en la fase orgánica), 100 μL del agente derivatizante (en este caso se seleccionó el Ac_2O) y 0,36 g de KHCO_3 (base empleada como catalizadora de la reacción); con la adición de la disolución patrón a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. La disolución con la muestra se mantuvo bajo agitación manual durante un minuto para eliminar el CO_2 que se desprende tras el uso de sales de carbonato en estos procedimientos de derivatización y, a continuación, se introduce en el vial la barra de agitación magnética y el dispositivo provisto de la membrana. Se introdujeron 400 μL de cada uno de los disolventes seleccionados en el interior de la membrana. El dispositivo se introduce en un baño de agua a temperatura constante de 35 $^{\circ}\text{C}$ y se mantiene bajo agitación magnética 60 min a 500 rpm. Al finalizar el tiempo de extracción, los extractos (disolvente situado dentro de la membrana) se concentran a sequedad bajo corriente de nitrógeno con ayuda del dispositivo Mini-Vap y se reconstituyen en 400 μL de acetato de etilo para su posterior inyección en el equipo de GC-MS.

En el caso de la derivatización por sililación, el proceso se realizó de manera análoga a la descrita, pero con acidificación de la muestra a pH 2 con HCl 1 mol L^{-1} y evidentemente sin adicionar Ac_2O ni base (KHCO_3). El objetivo de acidificar la muestra es neutralizar los compuestos presentes en el agua para favorecer el paso desde la fase acuosa a la orgánica, seleccionando para ello un pH inferior al valor de pK_a de los analitos. Además,

en este caso el extracto se reconstituyó con 400 μL de acetato de etilo y se procedió a su derivatización incorporando 20 μL de MTBSTFA a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Los resultados de las extracciones mediante acilación (Figura IV.10.a) producen resultados similares que los obtenidos con la sililación *post*-extracción (Figura IV.10.b). Como se puede observar, a excepción del BzP, los mejores resultados se obtuvieron empleando el cloroformo como disolvente, siendo éste además el único capaz de extraer cantidades significativas de los parabenes más polares (MeP y EtP), por lo que se seleccionó como el disolvente aceptor más adecuado para continuar el estudio.

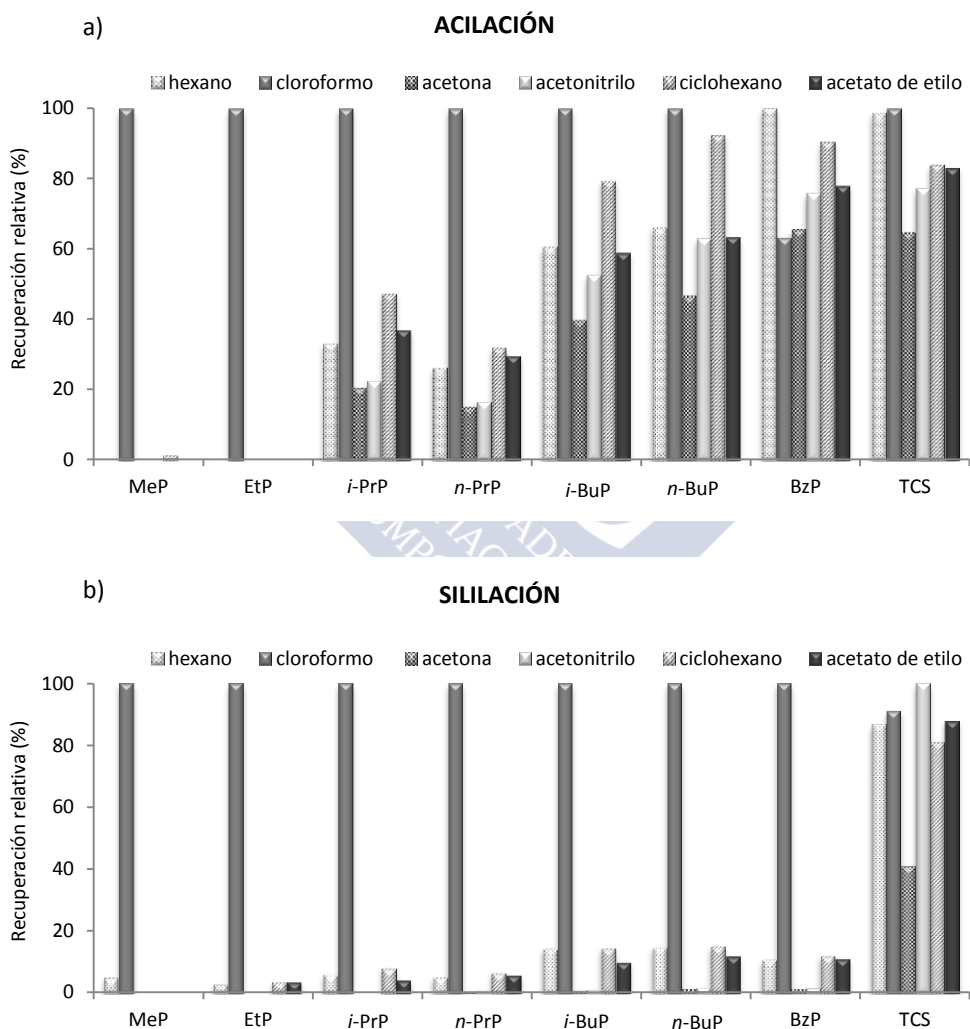


Figura IV.10. Recuperaciones relativas (%) obtenidas empleando los diferentes disolventes de extracción con un procedimiento de extracción mediante a) acilación y b) sililación.

Selección del agente derivatizante

Una vez seleccionado el disolvente de extracción se comenzó a estudiar de forma detallada el efecto de la derivatización. Para ello, se evaluaron un reactivo derivatizante sililante en medio orgánico *post*-extracción (MTBSTFA) y dos reactivos acilantes en medio acuoso (Ac_2O y *i*BCF), que podrían favorecer el proceso de extracción al producir especies más apolares. Según lo recogido en la bibliografía, la acilación suele realizarse en presencia de hidrogenocarbonato o carbonato y piridina como base catalizadora para la derivatización con Ac_2O y *i*BCF, respectivamente [704,742-744]. Sin embargo, el uso de sales de carbonato en este tipo de procedimientos de derivatización conlleva a la producción de burbujas de CO_2 , que pueden adherirse a las paredes de la superficie de la membrana pudiendo entorpecer la difusión de los analitos a través de la membrana hacia el disolvente aceptor. Por otro lado, la piridina, comúnmente empleada en la derivatización con *i*BCF, es una sustancia potencialmente tóxica. Por tanto, el empleo de K_2HPO_4 [154] se consideró también como otra posible alternativa.

Estos ensayos se realizaron por duplicado de manera análoga a la indicada en el apartado anterior: 18 mL de agua Milli-Q, 15 % NaCl, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ disolución de analitos y 400 μL de disolvente orgánico receptor (cloroformo), adicionando previamente (acilación) o sobre el extracto (sililación) los agentes derivatizantes y las bases catalizadoras a evaluar. La extracción se realiza en un baño a temperatura constante de 35 °C y bajo agitación magnética a 500 rpm durante 60 min. Como paso final, el cloroformo recogido del interior de las membranas se lleva a sequedad bajo una corriente de nitrógeno en el Mini-Vap y se reconstituye con 400 μL de hexano o acetato de etilo para derivatización de acilación o sililación, respectivamente.

La sililación se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante la adición de 20 μL de MTBSTFA sobre 400 μL del extracto reconstituido en acetato de etilo, posteriormente a la extracción mediante MASE de una muestra de agua Milli-Q de pH 2.

La acilación se realizó *in situ* mediante la adición de la base y 100 μL del reactivo acilante (Ac_2O o *i*BCF) sobre la muestra de agua Milli-Q previamente a la extracción con MASE. En este caso se estudiaron las combinaciones frecuentemente empleadas [154,704,742-744] entre los agentes derivatizantes y las bases seleccionadas:

- 100 μL Ac_2O + 0,36 g KHCO_3
- 100 μL Ac_2O + 0,18 g K_2HPO_4
- 100 μL *i*BCF + $0,02 \text{ g mL}^{-1}$ KHCO_3
- 100 μL *i*BCF + 50 μL Py

La Figura IV.11 presenta en forma de resultados gráficos las recuperaciones relativas al de mayor respuesta, donde se puede observar cómo para aquellos analitos más hidrofóbicos, como el TCS o el BzP, se obtienen mejores recuperaciones mediante las derivatizaciones por sililación con MTBSTFA. Por otro lado, para los analitos más polares (MeP) la sililación *post*-extracción no es una buena estrategia, siendo los resultados notablemente mejores mediante acilación como resultado de un aumento de la hidrofobicidad de los derivados acilados. Además, para la mayoría de los compuestos, el uso de K_2HPO_4 durante la acilación conduce a un aumento de las eficacias de extracción frente al uso de las bases más tradicionales: $KHCO_3$ o piridina. También se aprecia una notable diferencia entre la derivatización con *i*BCF e Ac_2O , siendo este último el que proporciona mejores resultados. Por tanto, se decide continuar con Ac_2O como agente derivatizante acilante y K_2HPO_4 como base para los posteriores experimentos.

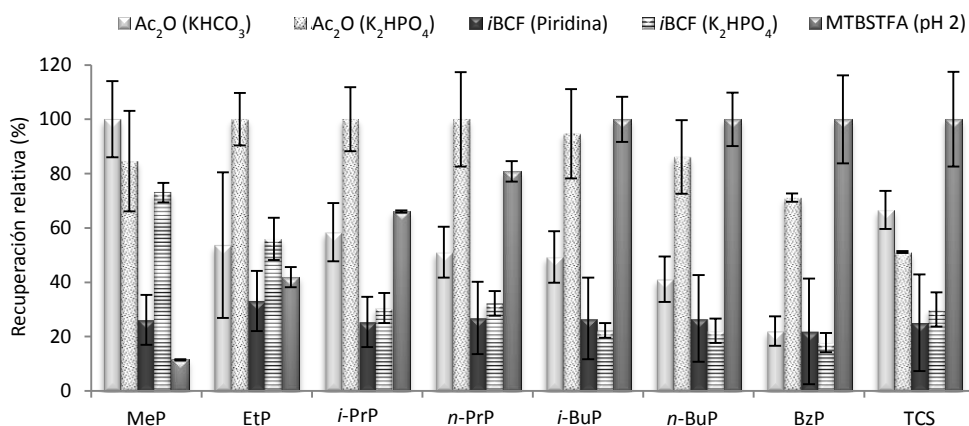


Figura IV.11. Comparación de las recuperaciones relativas (%) al de mayor respuesta de los diferentes agentes derivatizantes.

Optimización de otros parámetros de extracción y derivatización

Se realizaron más experimentos para obtener las condiciones experimentales óptimas de la derivatización y de la extracción de los compuestos de interés. Los parámetros experimentales considerados son la fuerza iónica (adición NaCl), la cantidad de reactivo derivatizante y tiempos de extracción y derivatización. Aunque la temperatura a la que se realiza la extracción podría representar un papel importante sobre las cinéticas de extracción y el rendimiento [579,745,746], se mantuvo a 35 °C puesto que el punto de ebullición del cloroformo es 61 °C y temperaturas superiores a este valor podrían causar sobrepresión en la membrana conllevando a una pérdida de disolvente. Por otro lado, es

más complicado controlar temperaturas inferiores en el laboratorio y requeriría mayores tiempos de extracción.

En los experimentos realizados previamente, los compuestos más hidrofóbicos se presentaban en el cromatograma como mezclas de especies derivatizadas y sin derivatizar. Esto podría ser debido a la alta capacidad de extracción que poseen estos compuestos incluso en su forma natural, lo que no confiere tiempo suficiente para lograr una acilación completa previa a la extracción. Por tanto, se añadió una etapa de preagitación tras la adición del agente derivatizante a la muestra y antes de la correspondiente extracción mediante MASE. Este parámetro del tiempo de preagitación fue estudiado simultáneamente con el efecto de la fuerza iónica (adición NaCl) y con la cantidad de Ac_2O por medio de un diseño experimental del tipo Box-Behnken con 3 puntos centrales y 15 experimentos (Tabla IV.5).

Tabla IV.5. Plan de experimentación del diseño y dominio experimental.

CONDICIONES	NaCl (g)	Ac_2O (μL)	TIEMPO DE PREAGITACIÓN (min)
Nivel bajo	0	20	0
Nivel central	2,5	110	10
Nivel alto	5	200	20
EXPERIMENTO	NaCl (g)	Ac_2O (μL)	TIEMPO DE PREAGITACIÓN (min)
1	5	20	10
2	5	200	10
3	0	20	10
4	2,5	110	10
5	0	110	0
6	2,5	110	10
7	2,5	20	20
8	2,5	200	0
9	5	110	0
10	2,5	200	20
11	5	110	20
12	0	110	20
13	2,5	20	0
14	2,5	110	10
15	0	200	10

Estos experimentos se llevaron a cabo con alícuotas de 18 mL de muestra de agua Milli-Q a las que se les añadió además: 0,2 g K_2HPO_4 , y una concentración de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de los

compuestos de interés. Las extracciones se llevaron a cabo a una temperatura de 35 °C durante 60 min a 500 rpm, utilizando como disolvente cloroformo (400 µL).

Una vez realizados los experimentos, los resultados (áreas) fueron analizados con el programa informático Statgraphics. Tal y como se muestra en la Tabla IV.6, la adición de NaCl genera un efecto estadísticamente significativo de forma negativa sobre los analitos más hidrofóbicos (ej. *n*-PrP, *i*-BuP, *n*-BuP, BzP y TCS), donde al aumentar la cantidad de NaCl la eficacia de extracción de los mismos disminuye. El volumen de Ac₂O sólo resulta ser estadísticamente significativo para el TCS ejerciendo un efecto negativo en cuanto al rendimiento de la extracción. Por último, el tiempo de preagitación no muestra efectos estadísticamente significativos sobre los términos de primer orden, sin embargo, sí que ejerce un efecto estadísticamente significativo de signo negativo sobre los términos de segundo orden (CC) para los analitos más polares (MeP, EtP, *i*-PrP y *n*-PrP), lo que significa que la respuesta obtenida no sigue un comportamiento lineal, sino que representa una forma cóncava, y, como se recoge en la Figura IV.12 para el MeP, lo mejor sería trabajar a niveles intermedios (aprox. 10 min). Lo mismo ocurre para el término de segundo orden AA afectando al *n*-PrP (Fig. IV.12) y para el TCS, sin embargo en este último caso, la respuesta representa una forma convexa implicando que los niveles que proporcionan mejores respuestas para el TCS se encuentran en los extremos, es decir sin adicionar o tras la adición de la máxima cantidad estudiada. Por otro lado, los términos de la interacción entre los diferentes factores no resultaron estadísticamente significativos en ninguno de los casos.

Tabla IV.6. Importancia relativa (con sus signos) de los efectos principales de los factores y de las interacciones de segundo orden en el diseño Box-Behnken.

FACTORES	MeP	EtP	<i>i</i> -PrP	<i>n</i> -PrP	<i>i</i> -BuP	<i>n</i> -BuP	BzP	TCS
A: NaCl (g)	+	+	-	--	--	--	--	--
B: Ac ₂ O (µL)	-	-	+	+	+	+	+	--
C: tiempo de preagitación (min)	+	+	+	+	+	+	-	-
AA	-	-	-	--	-	-	-	++
BB	+	+	+	+	-	-	-	+
CC	--	--	--	--	-	-	-	-
AB	+	+	+	+	+	+	-	+
AC	+	+	+	+	+	+	+	+
BC	-	-	+	+	+	+	+	+

+ o - indican que el efecto no es estadísticamente significativo y ++ o -- indican un efecto estadísticamente significativo (95 % de nivel de confianza), positivo o negativo, respectivamente.

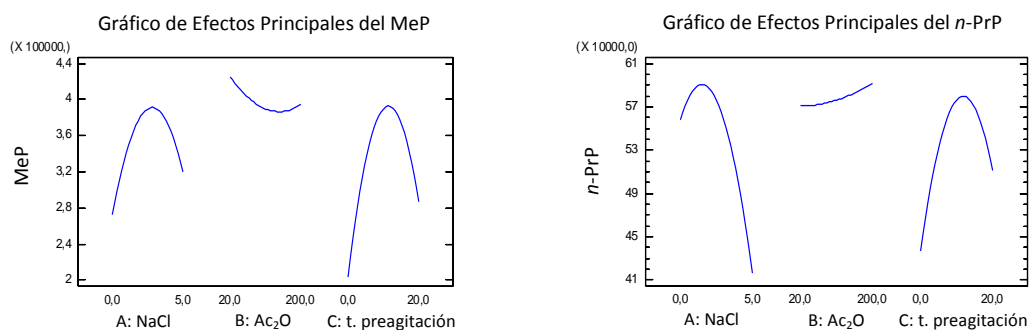


Figura IV.12. Gráfico de efectos principales del MeP y *n*-PrP.

En vista de la complejidad de los resultados y de los diferentes comportamientos obtenidos en función de la polaridad de los compuestos estudiados, se decidió llevar a cabo la selección de las mejores condiciones de compromiso por medio de una optimización multicriterio con funciones de deseabilidad de tipo lineal, en la que se busca el máximo de la función de deseabilidad global [747-749]. La Figura IV.13 muestra el gráfico de superficie de la función de deseabilidad global frente al tiempo de preagitación y el contenido de NaCl, manteniendo constante el volumen de Ac₂O en el nivel mínimo (20 μ L). El valor de deseabilidad máximo de esta función se obtuvo empleando pequeñas cantidades de NaCl (0,19 g), bajos volúmenes de Ac₂O (20 μ L) y tiempos de preagitación intermedios (7,97 min). Por tanto, con el objetivo de simplificar el proceso, se fijaron finalmente las siguientes condiciones: no adicionar NaCl, 20 μ L de Ac₂O y 8 min de preagitación.

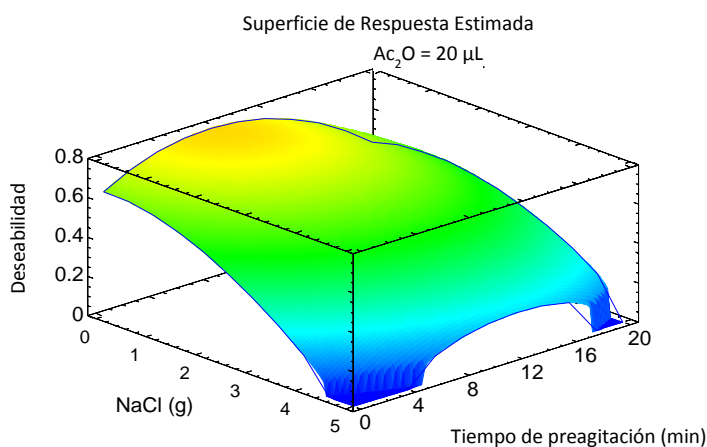


Figura IV.13. Gráfico de la superficie de respuesta.

Este procedimiento se evaluó también con aguas residuales (influyente y efluente) adicionando los analitos bajo las condiciones recientemente optimizadas. El análisis de las aguas de efluente arroja unos resultados similares a los obtenidos con agua Milli-Q. Sin embargo, las aguas de influente muestran una reducción de la señal para algunos analitos (PrP, BuP y BzP) causada por una incompleta derivatización de los analitos, ya que aparecen en el cromatograma picos correspondientes a los analitos sin derivatizar. Por tanto, para tratar de solventar este problema, se reevaluó el tiempo de preagitación y el volumen de agente derivatizante mediante un estudio univariante empleando aguas de influente con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de los compuestos. Los resultados mostraron que el incremento del tiempo de preagitación no ejerce ninguna variación sobre la derivatización (Figura IV.14), mientras que el aumento del volumen de agente derivatizante empleado conlleva una notable mejoría en la derivatización y por tanto en la respuesta, particularmente para los isómeros del PrP y BuP, al igual que para el BzP (Figura IV.15). Por tanto, el volumen de Ac_2O se fijó finalmente en $200 \mu\text{L}$ y el tiempo de preagitación se mantuvo en 8 minutos.

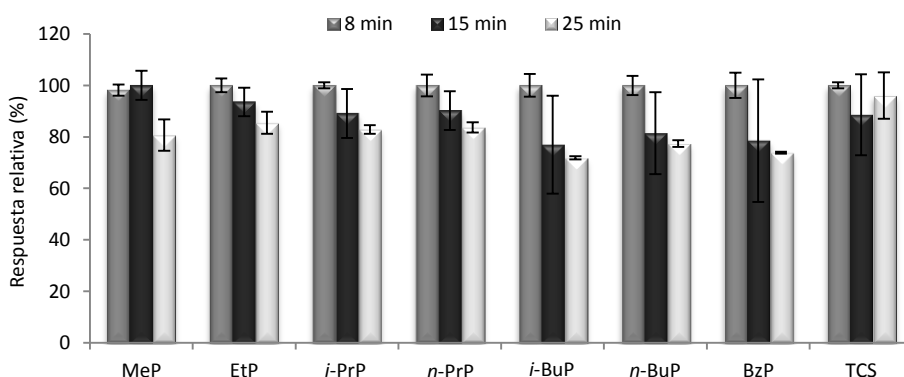


Figura IV.14. Respuesta relativa (%) del efecto del tiempo de preagitación sobre la derivatización/extracción de los parabenes y el triclosán en aguas residuales de influente.

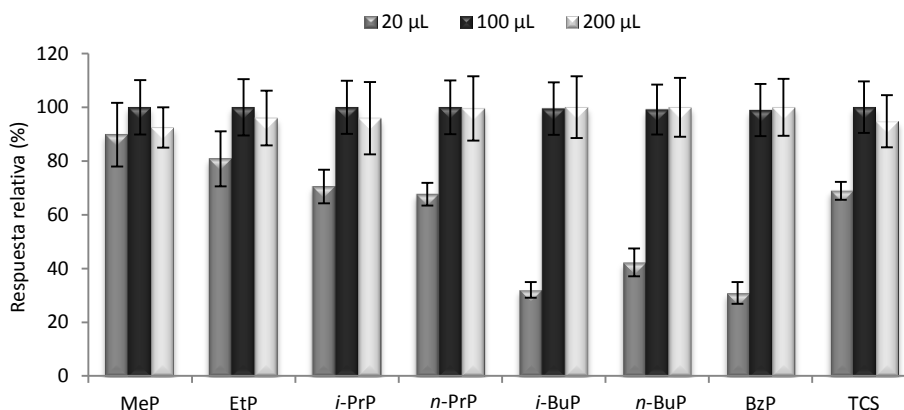


Figura IV.15. Respuesta relativa (%) del efecto del volumen de Ac_2O sobre la derivatización/extracción de los parabenes y el triclosán en aguas residuales de influente.

Estudio de la cinética de extracción

Para finalizar el proceso de optimización se estudió el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio en el proceso MASE. Este estudio se llevó a cabo con adición de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de concentración conocida de compuestos en disolución bajo las condiciones optimizadas previamente: 0,2 g de K_2HPO_4 , 18 mL agua Milli-Q, 200 μL de Ac_2O y 8 min como tiempo de preagitación. Tras ello, se procedió a la apertura del vial, introduciendo el embudo con la membrana en cuyo interior se aloja el cloroformo (400 μL) y situando los viales en el baño termostatzado a 35°C bajo agitación a 500 rpm. Se efectuaron tres réplicas para cada uno de los tiempos de extracción: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. Los resultados de estos ensayos aparecen representados de forma gráfica en la Figura IV.16.

Como se puede observar (Fig. IV.16) la influencia del tiempo de extracción es insignificante para aquellos analitos menos polares como el BzP y el TCS. En el caso de los isómeros de PrP y BuP el equilibrio se alcanza aproximadamente tras los 60 minutos. Sin embargo, para aquellos compuestos más polares como el MeP y el EtP necesitan tiempos superiores en torno a los 90 minutos. Finalmente, decidió fijarse el tiempo óptimo de extracción en 90 minutos teniendo la seguridad de que se ha alcanzado el equilibrio para todos los compuestos y, por tanto, la máxima eficacia de extracción.

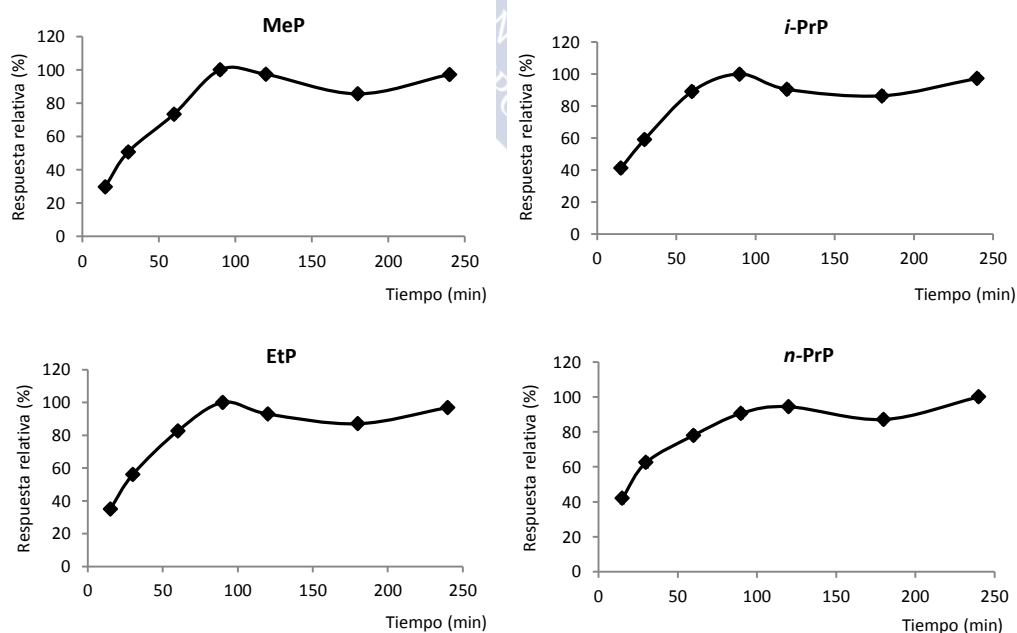


Figura IV.16. Representación de las cinéticas de extracción para parabenos y triclosán.

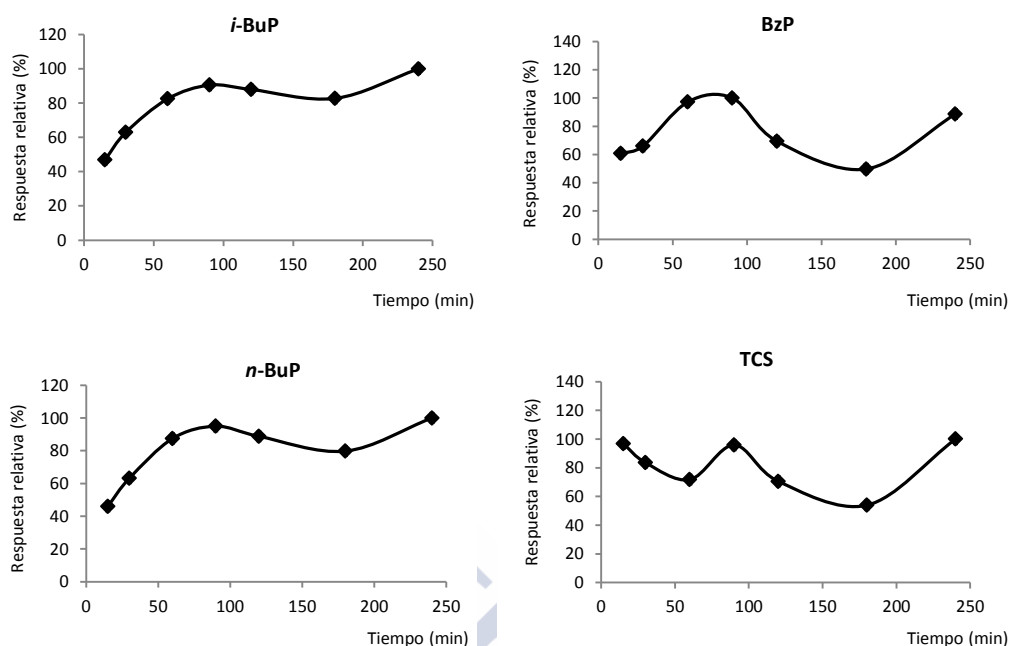


Figura IV.16. Continuación.

2.1.3 Caracterización analítica del método

La validación del método desarrollado se presenta por medio de estudios de linealidad, precisión, eficacia de extracción y mediante los valores de LODs y LOQs. A lo largo de esta sección se presentarán los estudios detallados de cada uno de ellos.

Linealidad

El estudio de la linealidad de la respuesta analítica se evaluó mediante la extracción por duplicado de muestras de agua Milli-Q adicionando concentraciones conocidas de analitos a 8 diferentes niveles: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000 y 5.000 ng L⁻¹. La calibración se llevó a cabo mediante el método de los ISs, utilizando los correspondientes patrones marcados isotópicamente a un nivel de 100 ng L⁻¹.

Los resultados de la calibración para cada uno de los compuestos están recopilados en la Tabla IV.7. Se puede observar como la calibración proporciona unos adecuados $R^2 > 0,994$ en todos los casos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV.7. Parámetros de las rectas de calibrado, eficacias de extracción, factor de concentración (F.C.), repetibilidad (RSD (%)), recuperaciones relativas, LODs y LOQs (ng L^{-1}) para el procedimiento MASE-(LVI)-GC-(EI)-MS/MS(IT).

COMPUESTO	CALIBRADO CON IS	% EFICACIA EXTRACCIÓN \pm SD	F.C.	RSD (%)	% RECUPERACIÓN RELATIVA (RSD)		LODs (ng L^{-1})	LOQs (ng L^{-1})
					Efluente	Influente		
MeP	$y=0,041x-3,484$ $R^2: 0,9967$	46 ± 12	20,7	5,0	101 (13)	99 (8)	0,3	1,0
EtP	$y=0,008x-0,629$ $R^2: 0,9968$	46 ± 8	20,7	5,4	97 (11)	101 (6)	1,4 ^a	4,6 ^a
<i>i</i> -PrP	$y=0,011x+0,187$ $R^2: 0,9980$	89 ± 12	40,5	6,8	84 (7)	104 (3)	0,1 ^a	0,2 ^a
<i>n</i> -PrP	$y=0,019x+0,624$ $R^2: 0,9973$	104 ± 11	46,8	5,3	83 (7)	101 (3)	0,7	2,2
<i>i</i> -BuP	$y=0,016x+0,367$ $R^2: 0,9973$	96 ± 9	43,2	4,3	91 (6)	100 (2)	0,4	1,2
<i>n</i> -BuP	$y=0,020x+0,663$ $R^2: 0,9975$	104 ± 12	46,8	6,2	91 (9)	95 (3)	0,6	1,9
BzP	$y=0,003x+0,159$ $R^2: 0,9938$	110 ± 10	49,5	8,3	91 (10)	83 (6)	0,6	2,0
TCS	$y=1,601x+0,010$ $R^2: 0,9963$	98 ± 15	44,1	5,8	90 (17)	96 (2)	1,1	3,6

^a Calculados como $\text{LOD}=3 \cdot \text{S/N}$ o $\text{LOQ}=10 \cdot \text{S/N}$; el resto calculados como $\text{LOD}=3 \cdot \text{SD}$ o $\text{LOQ}=10 \cdot \text{SD}$.

Eficacia de extracción y precisión

La eficacia de la extracción de los analitos fue estimada mediante una comparación entre una extracción mediante MASE bajo condiciones optimizadas ($n=6$) y un estándar de los compuestos derivatizados preparados mediante una acetilación acuosa empleando LLE. El procedimiento seguido para la preparación de este patrón mediante LLE consistió en añadir una cantidad conocida de analitos (200 ng L^{-1}) sobre una muestra de 1,5 mL de agua Milli-Q, junto con 0,02 g de K_2HPO_4 y 20 μL de Ac_2O , manteniendo a continuación una etapa de agitación durante 5 min. Posteriormente, se adicionan 1,5 mL de cloroformo y se repite

una etapa de agitación de 3 minutos. Finalmente, se retira la fase orgánica de la mezcla y se inyecta en el sistema GC-(LVI)-GC-MS/MS.

Las eficacias de extracción obtenidas (Tabla IV.7) muestran unos valores superiores al 89 % para la mayoría de los analitos de interés. No obstante, para aquellos analitos de mayor polaridad, como el MeP y el EtP, la eficacia de extracción es inferior, en torno a un 46 %. En general, estos valores se pueden considerar satisfactorios, teniendo en cuenta que la técnica de extracción MASE está considerada como un modelo de microextracción basada en procesos de equilibrio más que en procesos exhaustivos como son las técnicas clásicas de LLE o SPE. En comparación con otras técnicas de microextracción como la HF-LPME [574] estos resultados son notablemente superiores principalmente para los analitos más apolares.

Se evaluaron también los factores de concentración de los analitos obtenidos proporcionados por esta metodología calculados según la Ecuación 2, teniendo en cuenta el volumen de muestra inicial (18 mL), el volumen del extracto (400 µL) y las eficacias de extracción obtenidas. En la Tabla IV.7 se recogen los factores de concentración obtenidos para cada uno de los analitos con valores de concentración de hasta casi unas 50 veces.

$$\text{Factor concentración} = \frac{\text{volumen de muestra}}{\text{volumen extracto}} \times \text{eficacia extracción}$$

Ecuación 2. Ecuación del factor de concentración.

La precisión del método desarrollado se evaluó en base a un estudio de la repetibilidad, expresada como RSD (%), mediante la extracción simultánea de muestras de agua Milli-Q (n=6) con 100 ng L⁻¹ de analitos y 100 ng L⁻¹ de ISs.

Los resultados quedan recogidos en la Tabla IV.7, donde se pueden apreciar niveles de RSDs inferiores al 9 %. Estos últimos resultados se pueden considerar satisfactorios puesto que se obtienen niveles de RSDs similares a los proporcionados por técnicas de extracción más exhaustivas como la SPE [127,131,133] e incluso frente a otras técnicas no cuantitativas SPME [50], SBSE [128,195] o HF-LPME [573,574].

Efectos de matriz y exactitud

Sabiendo que MASE es una técnica basada en procesos de equilibrio, la matriz de la muestra podría reducir la concentración efectiva de los analitos en la fase acuosa y, por tanto, disminuir la cantidad transferida a la fase orgánica aceptora. En este caso, se evaluaron los posibles efectos de matriz de la extracción mediante la comparación de las respuestas obtenidas de una muestra de agua Milli-Q y muestras de aguas residuales (efluente e influente), teniendo como principal diferencia el contenido en materia orgánica (influente mayor porcentaje de materia orgánica). Al mismo tiempo se realiza un estudio de la corrección de los efectos de matriz mediante el uso de patrones marcados isotópicamente.

Los efectos de matriz (%) fueron calculados de acuerdo con la Ecuación 3, determinándose la presencia o no del mismo mediante la proximidad al 100 %, puesto que ese valor es el correspondiente a una muestra de agua Milli-Q. Con lo que aquellas muestras que presenten efectos de matriz distantes al 100 %, ya sea por encima o por debajo, implicarían la presencia del mismo y sería más intenso cuanto mayor sea la distancia.

$$EM (\%) = 100 \times \frac{Respuesta_{muestra\ con\ adición} - Respuesta_{muestra\ sin\ adición}}{Respuesta_{agua\ Milli-Q\ con\ adición}}$$

Ecuación 3. Ecuación empleada para el cálculo de los efectos de matriz en la extracción (%).

Con este fin, se seleccionaron muestras de efluente e influente a las que se les adicionaron concentraciones conocidas de los analitos a niveles de 100 y 5.000 ng L⁻¹, respectivamente. Se realizaron cuatro réplicas para cada una de las matrices de agua estudiadas. Por otro lado, también se realizaron extracciones sin adición de analitos para los dos tipos de aguas, obteniendo de este modo mediante comparación, las áreas de los picos correspondientes a la adición de los analitos.

En vista de los resultados presentados en la Figura IV.17, se puede decir que no se aprecian apenas efectos de matriz sobre los parabenos, puesto que los valores son próximos al 100 %. Sin embargo, no se puede decir lo mismo del TCS, ya que los efectos de matriz son próximos al 50 %. Estos efectos se ven compensados mediante el uso de los ISs, mejorando al mismo tiempo la precisión del método para todos los analitos. Tal y como se muestra en la Tabla IV.7, el uso de ISs consigue excelentes correcciones con recuperaciones relativas del 96 %. Por tanto, para el caso del TCS la cuantificación debe realizarse

necesariamente mediante la adición del correspondiente IS, no siendo obligatorio su uso para los parabenes.

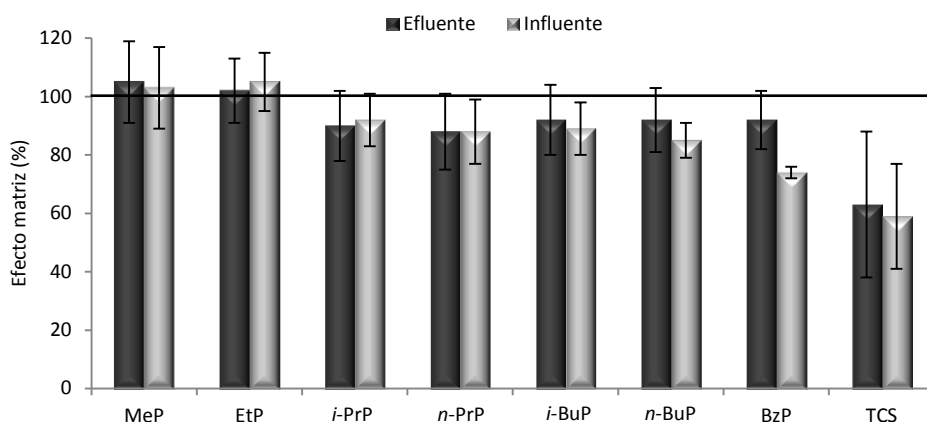


Figura IV.17. Efecto matriz (%) en la extracción mediante MASE de aguas residuales de efluente e influente.

LODs, LOQs y blancos de extracción

El cálculo de los LODs y de los LOQs de la metodología desarrollada se calculó por medio de dos aproximaciones diferentes. Por un lado basándose en extracciones MASE de blancos ($n=6$) (método *b* en Sección IV.1), en donde el LOD se obtiene como el resultado 3 veces la SD del blanco ($LOD = 3 \cdot SD$); y por otro lado para aquellos compuestos no detectados en blancos como el EtP y el *i*-PrP, como 3 veces el valor de la relación S/N ($LOD = 3 \cdot S/N$) calculada en base a los niveles de la curva de calibración con muestras de agua (método *a* en Sección IV.1). Los niveles de LODs y LOQs seleccionados para cada analito fueron los que proporcionaron mayores valores entre ambas aproximaciones.

La Tabla IV.7 recoge los diferentes valores de los LODs y LOQs calculados teniendo en cuenta los diferentes métodos. Los LODs del procedimiento desarrollado se encuentran comprendidos entre $0,1$ y $1,4 \text{ ng L}^{-1}$ y los LOQs entre $0,2$ y $4,6 \text{ ng L}^{-1}$. Estos LODs son comparables a aquellos obtenidos por otras técnicas de microextracción como SPME ($1 - 25 \text{ ng L}^{-1}$) con volúmenes de muestra de 10 mL [50,154,582], SDME ($1 - 15 \text{ ng L}^{-1}$) con volúmenes de muestra de 3 mL [545] y DLLME o USAEME ($2 - 16 \text{ ng L}^{-1}$) para volúmenes de 10 mL [154,174].

2.1.4 Aplicación a muestras reales

Como última etapa de esta investigación, se aplicó el método desarrollado a la determinación de los compuestos de interés en muestras de aguas residuales (efluentes e influentes) y de aguas de ríos. Los detalles en cuanto al período de recolección, el tipo y la localización de las muestras empleadas en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.1.

La determinación de parabenos y triclosán en los tres tipos de muestras de aguas anteriormente citadas se realizó bajo las condiciones de extracción optimizadas ($n=4$), recogidas de forma esquemática en la Sección III.3.1. Se adicionaron a cada una de las muestras 100 ng L^{-1} de la disolución de los ISs. Como se muestra en la Tabla IV.8, y como era de esperar, los niveles más altos se encontraron en las muestras de influentes, con el MeP y el *n*-PrP como los analitos de mayor concentración. No obstante, se detectaron niveles inferiores en las aguas de efluentes indicando por tanto que los tratamientos de depuración aplicados resultan efectivos para eliminar de las aguas estos compuestos. Esta reducción de la concentración en las diferentes aguas de las depuradoras coincide con las tendencias descritas en la bibliografía [49,50,129,130]. Consecuentemente con esto, los niveles en ríos son menores a los detectados en aguas de influentes y menores o similares a su vez a los obtenidos en las aguas de efluentes.

Tabla IV.8. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de parabenos y triclosán en muestras de aguas residual y superficial ($n=4$).

ng L^{-1}	Octubre 2009			Enero 2010		
	Río	Efluente	Influente	Río	Efluente	Influente
MeP	nd	nd	26.194 ± 1.388	54 ± 8	nd	6.810 ± 267
EtP	30 ± 6	57 ± 10	1.943 ± 111	29 ± 2	nd	480 ± 14
<i>i</i>-PrP	nd	nd	$5,4 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$
<i>n</i>-PrP	nd	nd	1.737 ± 113	105 ± 7	nd	1.227 ± 63
<i>i</i>-BuP	nd	nd	106 ± 6	$4,8 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,1$	40 ± 3
<i>n</i>-BuP	nd	nd	172 ± 7	$6,4 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,3$	88 ± 5
BzP	nd	nd	nd	$2,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,2$
TCS	58 ± 5	178 ± 15	423 ± 22	138 ± 32	141 ± 20	1.142 ± 23

nd: no detectable ($<\text{LOD}$)

Por otro lado, en cuanto a las concentraciones detectadas de cada analito, se pone de manifiesto la existencia de una relación entre los valores encontrados y la producción industrial de los mismos. El analito más abundante es el MeP, seguido por el *n*-PrP y el EtP,

lo que concuerda con lo recogido en la bibliografía en cuanto a la producción y usos [50,131,133,134]. Por otro lado, el estudio de los isómeros de PrP y BuP muestran que tanto el *i*-BuP como el *n*-BuP se detectan en el mismo rango de concentraciones, mientras que para el caso del PrP, es el isómero lineal (*n*-PrP) el que se detecta en un mayor número de ocasiones y en todos los casos en mayor medida. Con respecto al BzP, su presencia en las muestras reales es nula en algunas de ellas o con valores no superiores a $4,7 \text{ ng L}^{-1}$ encontrados en influentes, coincidiendo de nuevo con los encontrados en la bibliografía, puesto que se trata de un compuesto raras veces detectable y de ser el caso con niveles similares a los detectados en uno de los influentes [124,133]. También cabe destacar la presencia del TCS en todas las muestras analizadas, incluyendo aguas superficiales, debido a la menor eficacia de eliminación en los tratamientos de aguas en la WWTP. En la Figura IV.18 se presenta un cromatograma de una muestra de agua residual de influente obtenida mediante la inyección en GC-(LVI)-MS/MS. Se incluyen, además, en la Figura IV.19 los espectros obtenidos del *n*-PrP y el TCS mediante una comparación entre un patrón y una muestra real, que permiten la identificación inequívoca de los analitos.

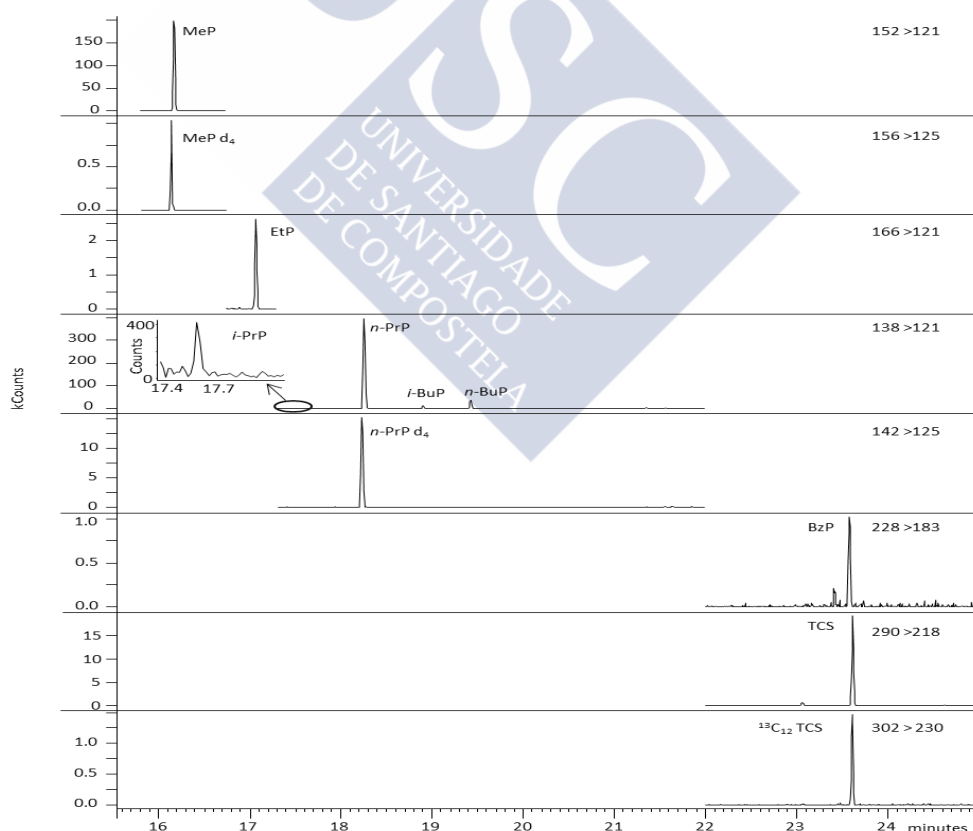


Figura IV.18. Cromatograma de una muestra real de influente (Enero 2010) para parabenes y triclosán (100 ng L^{-1} IS) mediante la inyección en el GC-(LVI)-MS/MS.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

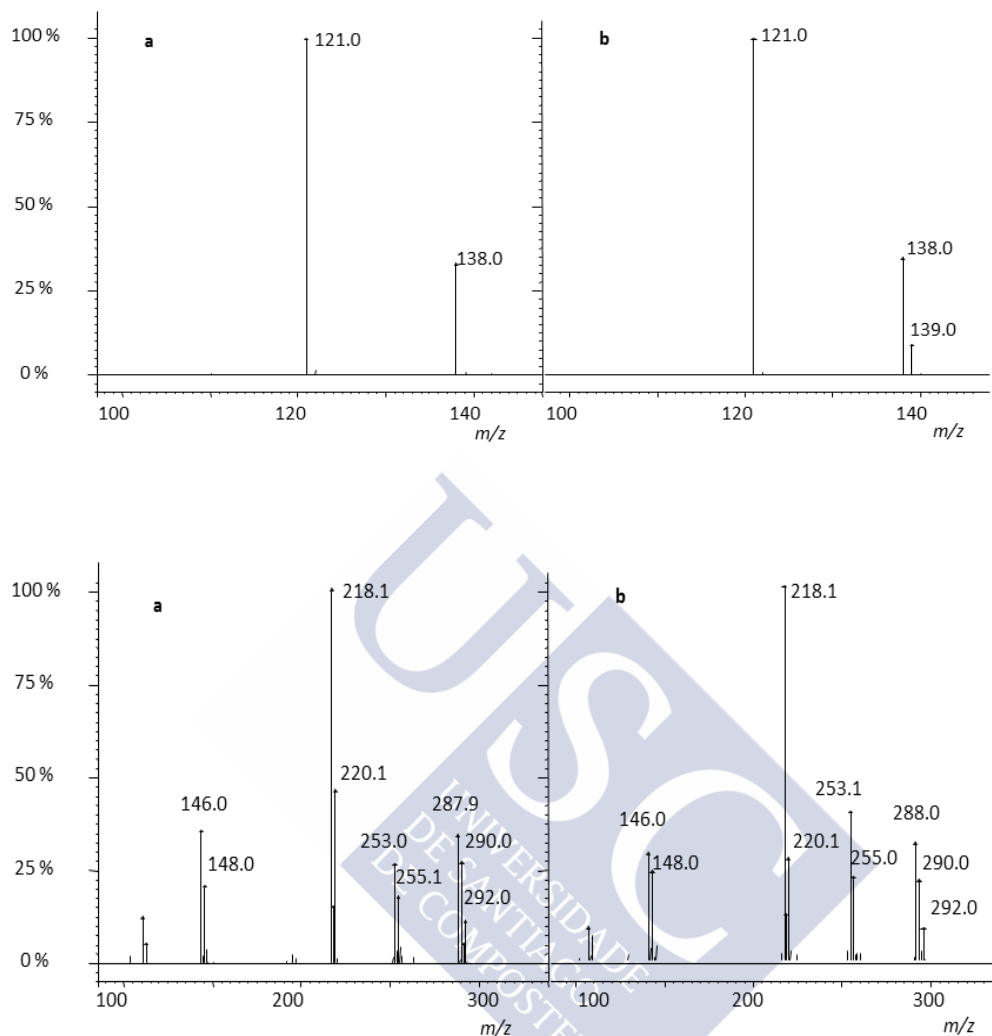


Figura IV.19. Comparación entre los espectros de masas obtenidos con: a) una muestra real y b) un patrón, para el *n*-PrP (imagen superior) y el triclosán (imagen inferior).

2.2 DETERMINACIÓN DE PARABENES EN MOLUSCOS MEDIANTE MSPD

2.2.1 Introducción y objetivos

Esta investigación establece como objetivo el desarrollo de un método analítico que permita realizar la separación y detección de siete parabenos clásicos y dos derivados clorados, en muestras de moluscos. Para cumplir este objetivo se selecciona la técnica MSPD, en base a las ventajas que aporta frente a otras técnicas más tradicionales. Tiene especial interés puesto que se trata de una técnica con un sistema de montaje bastante sencillo, con un consumo medio-bajo de disolventes y con un menor coste global. Su punto fuerte, siendo considerada por tanto su principal ventaja, es la posibilidad que ofrece al permitir realizar de forma simultánea la limpieza y extracción de los analitos, sin ser necesarias etapas adicionales posteriores a la extracción como suele ocurrir en las otras técnicas cuando se realizan extracciones de alto contenido lipídico.

El alto contenido lipídico característico de este tipo de matrices limita en gran medida la selección de la técnica de determinación. En este caso se selecciona la LC-(ESI)-MS/MS(QqQ), puesto que logra proporcionar satisfactorios resultados en cuanto a sensibilidad y selectividad, permitiendo la identificación inequívoca de todos los compuestos analizados.

Esta investigación tiene como principales objetivos:

- ✓ Optimización de las condiciones de extracción mediante MSPD: selección del disolvente de elución, elección del adsorbente y soporte sólido, y optimización mediante un diseño experimental de las cantidades necesarias de disolvente, adsorbente y soporte sólido.
- ✓ Validación del método: estudio de blancos, efectos de matriz, exactitud, precisión, LODs y LOQs.
- ✓ Aplicación a muestras reales: mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), berberechos (*Cerastoderma edule*) y almeja japónica (*Ruditapes philippinarum*).

2.2.2 Optimización de la técnica de extracción

Selección del disolvente de elución

Uno de los parámetros que se deben estudiar con detalle en la MSPD es el disolvente de elución de los analitos. Del mismo modo que en una SPE, la polaridad relativa del disolvente juega un papel muy importante determinando qué analitos permanecerán retenidos en la columna de MSPD y cuales lograrán ser eluidos. En una MSPD, la elución o retención de los analitos se considera como una segunda etapa, puesto que la primera será la extracción de los analitos de la matriz. Sin embargo, no es fácil predecir bajo qué condiciones de polaridad podrán eluirse todos los analitos de la matriz de la muestra [682]. Por ello es necesario efectuar un estudio con diversos disolventes de un amplio rango de polaridades para estudiar cómo afecta a la elución de cada uno de los analitos de interés.

Siguiendo con las recomendaciones recogidas en la bibliografía, se efectuó un estudio con diversos disolventes de diferentes polaridades, seleccionando diclorometano, acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, dietiléter y hexano. Las extracciones fueron realizadas por triplicado con cada uno de los disolventes. Para la realización de estas primeras pruebas se fijó la relación muestra/soporte sólido en 1:2 en base a trabajos previos [22,686]; empleando por tanto, 1 g de C₁₈ como soporte sólido (o agente dispersante) y 0,5 g de muestra de molusco (mejillón). Estos dos materiales se mezclan en un mortero de vidrio hasta obtener una mezcla perfectamente homogénea. En la jeringa donde tendrá lugar el proceso de elución, se sitúa inicialmente una frita de polietileno (20 µm) seguida de 2 g de sílice empleada como material adsorbente. A continuación, se añade la mezcla (muestra/soporte sólido) previamente dispersada a la que se le adicionan los analitos a una concentración de 40 ng g⁻¹, permitiendo la evaporación del disolvente durante unos pocos minutos previa a la colocación de la última frita. Seguidamente, se hacen pasar a través de la jeringa dos fracciones de 10 mL de los disolventes de elución seleccionados. Los eluatos se concentran a sequedad bajo corriente de nitrógeno con ayuda de dos concentradores (Turbo-Vap y Mini-Vap) y se reconstituyen con 100 µL de metanol para inyectarlos a continuación en el sistema LC-MS/MS.

Un valor a tener en cuenta para la selección disolvente óptimo, además de las recuperaciones, es el porcentaje de residuo seco (dr) constituido principalmente por compuestos lipídicos. Este parámetro se determinó gravimétricamente mediante la diferencia del vial antes de comenzar y el mismo vial que contiene al extracto después de la etapa de secado. Se buscan, además de elevadas recuperaciones, bajos porcentajes de materia grasa en el residuo seco evitando así la inyección de sustancias lipídicas en el equipo.

En cuanto a los resultados obtenidos se puede descartar la presencia de los analitos en la segunda fracción de elución, quedando recogidos en los primeros 10 mL de los disolventes. Por tanto, sólo se tuvieron en cuenta los niveles de residuo seco obtenidos en las primeras fracciones. Entre los diferentes disolventes estudiados, se rechazaron inicialmente el dietiléter y el metanol por su elevado contenido en materia grasa (~5 y 19 %, respectivamente). En vista de los resultados obtenidos (Figura IV.20), donde se presentan algunos de los analitos, MeP en representación de los parabenes no halogenados y ClMeP representando el Cl₂MeP por tener una ligera diferencia estructural con los anteriores, se decidió descartar también los disolventes de menor polaridad, como el hexano (dr~0,6 %) y el DCM (dr~2,5 %) puesto que no logran la elución de ningún analito. Estos resultados obtenidos con los disolventes menos polares coinciden con los resultados obtenidos por Canosa y col. [22] al extraer los mismos analitos con MSPD a partir de muestras de polvo. Finalmente, viendo que entre los resultados de las recuperaciones para el ACN (dr~0,35 %) y el AcOEt (dr~4,9 %) no se presentan diferencias significativas, se decide seleccionar ACN en base a su menor porcentaje de grasa en el extracto.

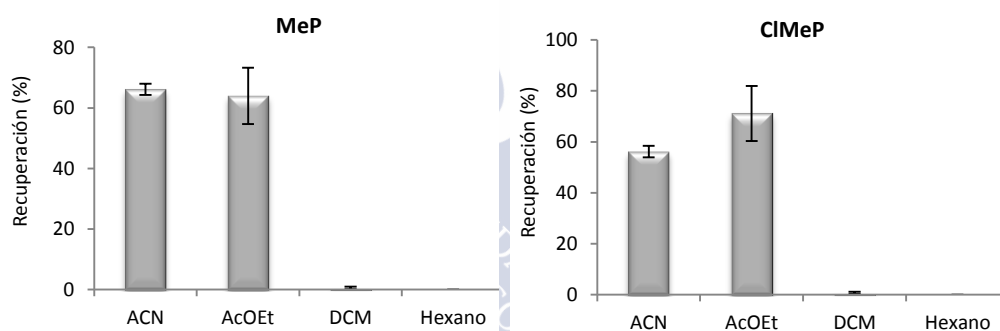


Figura IV.20. Recuperaciones (%) obtenidas para dos de los analitos representativos efectuando las eluciones con diferentes disolventes (10 mL).

Selección del adsorbente de limpieza

La técnica de MSPD tiene la ventaja de poder incorporar en el cartucho de extracción, en un nivel inferior a la mezcla homogénea muestra/suporte sólido, materiales adsorbentes para realizar la limpieza de la muestra simultáneamente a la elución de los analitos [750]. Por tanto, se decidió evaluar el poder de limpieza de varios adsorbentes de distinta naturaleza, un adsorbente en fase reversa (C₁₈), uno de modo mixto (PSA) y tres de fase normal (Florisil, alúmina y sílice).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las extracciones se realizaron por triplicado, homogeneizando 0,5 g de molusco con 1 g de C₁₈ (soporte sólido), con adición de los analitos a nivel de 40 ng g⁻¹ sobre la mezcla de la muestra una vez emplazada en la jeringa. Se situaron en el cartucho 2 g de los materiales adsorbentes a evaluar y la elución de los analitos se realizó con dos fracciones de 10 mL de ACN. Los extractos se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyeron en 100 µL de metanol para su inyección en el sistema.

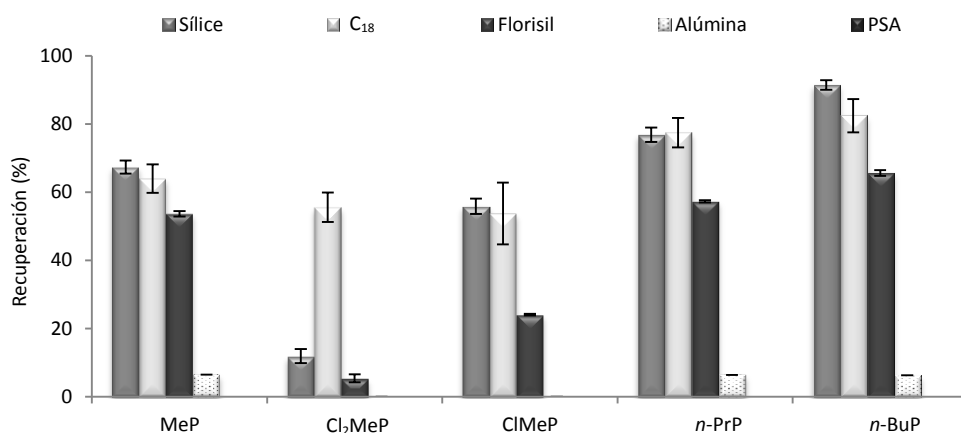


Figura IV.21. Recuperaciones (%) de algunos analitos representativos de parabenes realizando la extracción con diferentes adsorbentes con 10 mL ACN.

La Figura IV.21 muestra las recuperaciones obtenidas para algunos de los analitos, siendo el MeP representativo del EtP, y el *n*-PrP y *n*-BuP de sus respectivos isómeros, y este último (*n*-BuP) también del BzP. La recuperación en la segunda fracción de las eluciones es despreciable, quedando todos los analitos eluidos únicamente con 10 mL de ACN. Lo normal en esta prueba sería basar las conclusiones en los datos de residuo seco, sin embargo, las diferencias entre las recuperaciones de los analitos son tan notables que la selección del adsorbente se basará principalmente en los correspondientes valores. Se descartan inicialmente la alúmina (dr~0,6 %) y el PSA (dr~0,35 %) como materiales adsorbentes puesto que los analitos deben quedar retenidos y no logran ser eluidos, presentando valores de recuperación inferiores al 7 %. Se observó el mismo problema para el Florisil (dr~0,5 %) y la sílice (dr~0,3 %) para los derivados clorados, en especial con el Cl₂MeP, posiblemente como resultado del carácter altamente ácido de este analito. Por tanto, por descarte se seleccionó el C₁₈ (dr~0,6 %) como material adsorbente para los próximos experimentos.

Selección del soporte sólido (agente dispersante)

El agente dispersante es uno de los principales parámetros a evaluar y uno de los más importantes en la técnica de MSPD. Es el responsable de efectuar la rotura de las interacciones existentes dentro de la matriz de la muestra con los analitos, para quedar liberados y poder ser eluidos con un disolvente apropiado. Con este objetivo, se decidieron evaluar diferentes materiales para ejercer la función de soporte sólido, como sílice, arena, tierra de diatomeas, PSA, alúmina y Florisil.

Las extracciones se realizaron por triplicado empleando 0,5 g de molusco, homogeneizándolo con 1 g de los correspondientes soportes sólidos, adicionando los analitos a una concentración de 40 ng g^{-1} . Se situaron 2 g de C_{18} en el cartucho de MSPD y los analitos se eluyeron con dos fracciones de 10 mL de ACN, llevando a sequedad los eluatos y reconstituyendo con $100 \mu\text{L}$ de metanol para su inyección en el sistema.

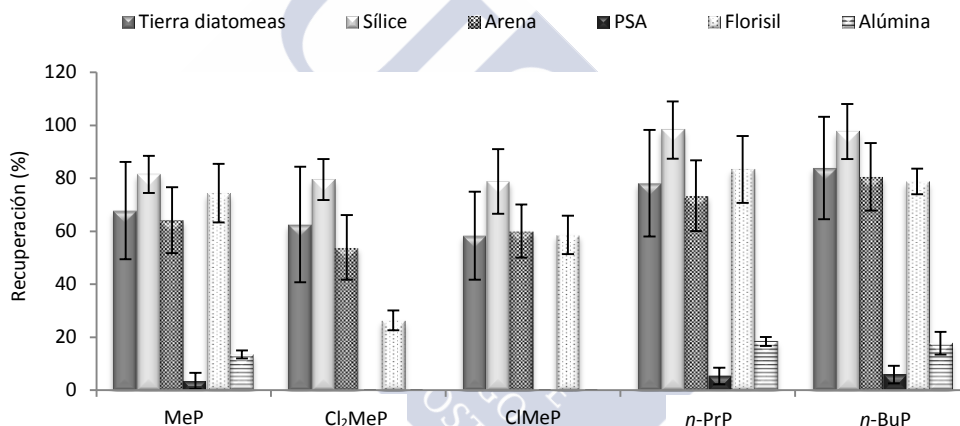


Figura IV.22. Recuperaciones (%) de algunos analitos representativos de parabenos realizando la extracción con diferentes soportes sólidos en 10 mL de ACN.

Al igual que en los casos anteriores, la recuperación de los compuestos en la segunda fracción de los eluatos es despreciable, quedando todos los analitos recogidos en los primeros 10 mL de ACN. Se puede ver (Figura IV.22) que tanto las extracciones empleando PSA ($\text{dr} \sim 0,25 \%$) y alúmina ($\text{dr} \sim 0,3 \%$) como soportes sólidos no logran la extracción de los analitos de la matriz de la muestra, en especial para los derivados clorados, con recuperaciones inferiores al 25 %, aunque proporcionan menores porcentajes de residuo seco. También se descarta el Florisil ($\text{dr} \sim 0,4 \%$) por sus bajas recuperaciones para el Cl_2MeP ($< 30 \%$). Entre los restantes soportes sólidos, se decidió seleccionar la sílice ($\text{dr} \sim 0,5 \%$) puesto que además de proporcionar recuperaciones un poco más altas genera también extractos más libres de grasa.

Optimización de las cantidades de disolvente, soporte sólido y adsorbente

Es importante optimizar la cantidad de los diferentes parámetros tenidos en cuenta en esta investigación con el fin de lograr una extracción máxima de los analitos contenidos en la matriz de la muestra. Para ello se evalúan, la cantidad de sílice empleada como agente dispersante (relación muestra/soporte sólido 1:1, 1:2, 1:4 que corresponden con 0,5, 1 y 2 g de soporte sólido, respectivamente), la cantidad de C_{18} usado como adsorbente (1 a 4 g) y el volumen de ACN necesario (5 a 20 mL). Para ello se decide realizar un diseño experimental del tipo Box-Behnken [751,752] compuesto por cuatro puntos centrales, permitiendo estudiar la optimización de los parámetros y de sus interacciones con 16 experimentos. La Tabla IV.9 muestra el plan experimental donde se recogen las diferentes combinaciones de los factores estudiados.

Tabla IV.9. Plan de experimentación del diseño y dominio experimental.

CONDICIONES	ADSORBENTE (g)	DISOLVENTE (mL)	SOPORTE SÓLIDO (g)
Material	C_{18}	ACN	Sílice
Nivel bajo	1	5	0,5
Nivel central	2,5	12,5	1,0
Nivel alto	4	20	2
EXPERIMENTO	ADSORBENTE (g)	DISOLVENTE (mL)	SOPORTE SÓLIDO (g)
1	1	12,5	0,5
2	1	12,5	2
3	4	12,5	0,5
4	4	12,5	2
5	2,5	5	0,5
6	2,5	5	2
7	2,5	20	0,5
8	2,5	20	2
9	1	5	1,25
10	4	5	1,25
11	1	20	1,25
12	4	20	1,25
13	2,5	12,5	1,25
14	2,5	12,5	1,25
15	2,5	12,5	1,25
16	2,5	12,5	1,25

Los experimentos para estas pruebas se efectuaron con muestras de 0,5 g de mejillón con adición de analitos a 40 ng g^{-1} , empleando las cantidades de los tres

parámetros a estudiar que se recogen en la Tabla IV.9, llevando los eluatos a sequedad bajo corriente de nitrógeno y reconstituyendo en un volumen final de 100 μ L de metanol.

Tabla IV.10. Importancia relativa (con sus signos) de los efectos principales de los factores y de las interacciones de segundo orden en el diseño Box-Behnken.

	MeP	Cl ₂ MeP	EtP	ClMeP	<i>i</i> -PrP	<i>n</i> -PrP	<i>i</i> -BuP	<i>n</i> -BuP	BzP	Grasa
A: soporte sólido (g)	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
B: adsorbente (g)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--
C: disolvente (mL)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	++
AA	-	--	-	--	--	--	--	-	--	-
BB	-	--	-	-	-	-	-	-	--	++
CC	-	--	-	--	--	--	--	--	--	-
AB	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
AC	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
BC	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+

+ o - indican que el efecto no es estadísticamente significativo y ++ o -- indican un efecto estadísticamente significativo (95 % de nivel de confianza), positiva o negativa, respectivamente.

Una vez obtenidos los resultados, expresados en áreas de cada analito y porcentajes de residuo seco correspondientes, se analizaron mediante el software quimiométrico Statgraphics 5 Plus (Manugistics, Rockville, MD, USA). Tal y como se recoge en la Tabla IV.10, la relación muestra/soporte sólido (A) no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo sobre los analitos. Sin embargo, el término de segundo orden asociado con este factor (AA, Tabla IV.10) sí resulta ser estadísticamente significativo para todos los analitos a excepción del MeP, EtP y *n*-BuP. Esto implica que la respuesta obtenida no sigue un comportamiento lineal, sino que presenta una forma cóncava, y, como se recoge en la Figura IV.23 para el BzP, el máximo de la respuesta del analito se logra en condiciones intermedias, ejemplo relación muestra/dispersante 1:2. En cuanto a la cantidad de adsorbente utilizada, ejerce una influencia positiva para todos los analitos, pero no resultó ser un factor estadísticamente significativo para ninguno de ellos. No obstante el término de segundo orden sí ejerce influencia estadísticamente significativa sobre el Cl₂MeP y el BzP, lo que conlleva tal y como se recoge anteriormente, una respuesta de tipo cóncava con una respuesta máxima en condiciones intermedias. Además, la cantidad de adsorbente, sí resulta ser un factor estadísticamente significativo para el residuo seco (grasa) afectando, como era de esperar, de modo negativo. Ello implica que a mayor cantidad de material adsorbente menor porcentaje de grasa en el extracto (Figura IV.23). El término de segundo orden también ejerce una influencia estadísticamente significativa sobre la cantidad de residuo seco, lo que implica, en este caso, respuestas convexas con

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

respuesta mínima a niveles intermedios. Por último, el volumen de disolvente es un factor estadísticamente significativo que afecta de forma positiva a la materia grasa, lo que quiere decir que un incremento en la cantidad de disolvente implica una mayor presencia de materia grasa en el extracto. El término cuadrático (CC, Tabla IV.10) es estadísticamente significativo para la mayoría de los analitos, indicando una respuesta cóncava (Figura IV.23, BzP). Por otro lado, observando los términos de interacción entre los diferentes factores, se observa una interacción estadísticamente significativa entre la cantidad de adsorbente y el volumen de disolvente utilizado (BC) para algunos analitos como el EtP, *n*-PrP o BzP.

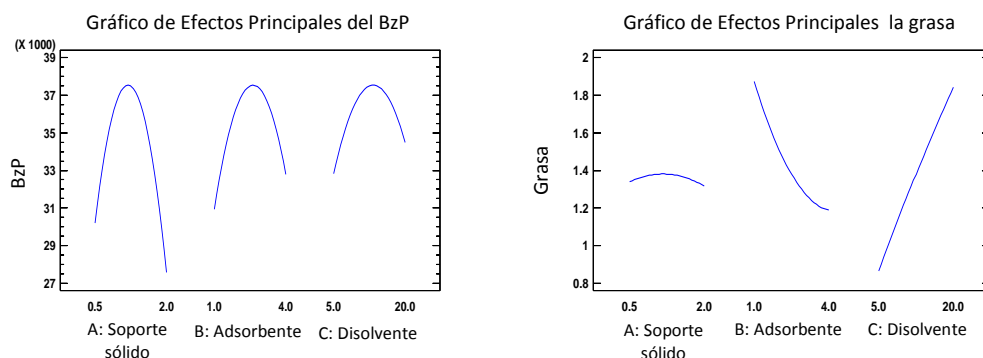


Figura IV.23. Gráfico de efectos principales del BzP y grasa.

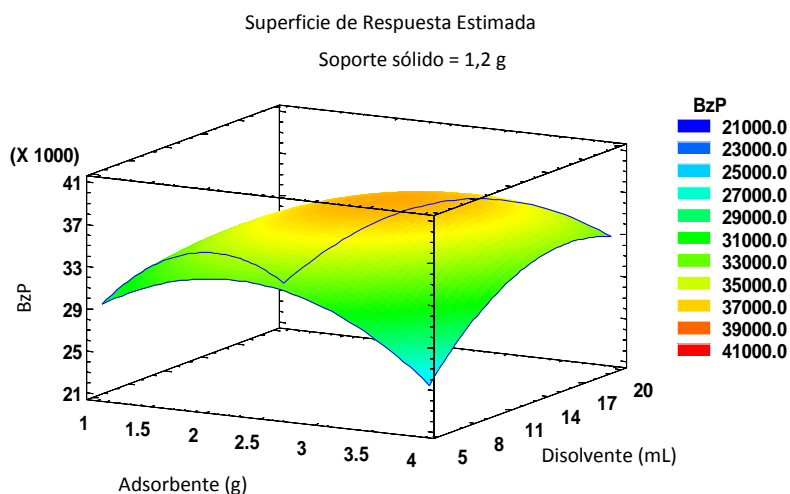


Figura IV.24. Gráfico de superficie de respuesta estimada del BzP.

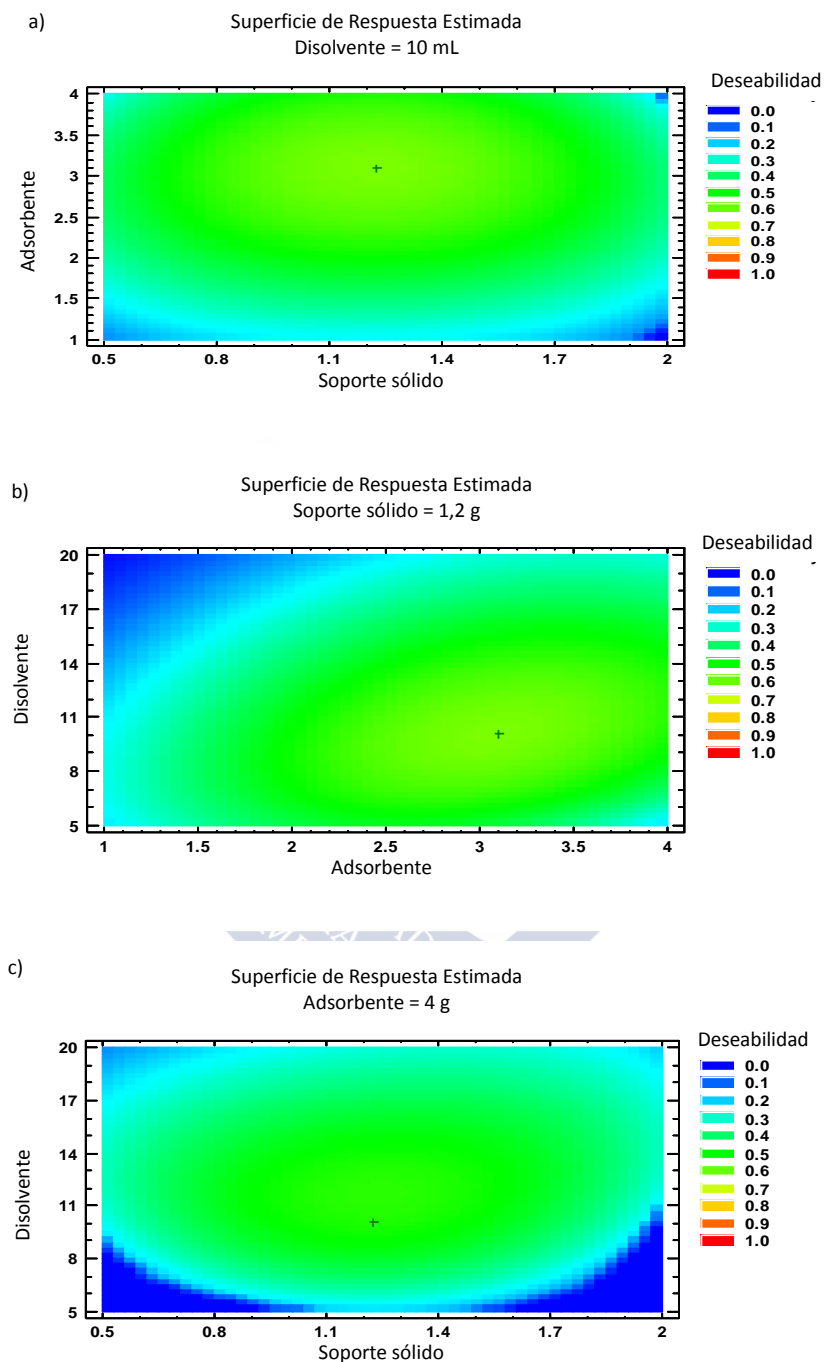


Figura IV.25. Gráfico de superficie de respuesta estimada de a) cantidad de soporte sólido (sílice) frente al adsorbente (C_{18}) con volumen de ACN fijo de 10 mL; b) cantidad de adsorbente frente a volumen de disolvente con una cantidad de soporte sólido fija de 1,2 g; c) cantidad de soporte sólido frente al volumen de ACN con cantidad de adsorbente fija de 4 g.

A modo ejemplo, se presenta en la Figura IV.24 la superficie de respuesta estimada para el BzP, donde se aprecia que se obtiene una respuesta inferior del BzP cuando se incrementa uno de los dos factores. Sin embargo, la respuesta máxima del BzP se obtiene a niveles intermedios de ambos factores.

Finalmente, para lograr maximizar las recuperaciones de forma simultánea para los analitos, minimizando al mismo tiempo la cantidad de materia grasa en los extractos, se evalúa el sistema por medio de una optimización multicriterio con funciones de deseabilidad de tipo lineal, en las que se busca el máximo de la función de deseabilidad global [749,753], sin necesidad de realizar nuevos experimentos. Para realizar la optimización multicriterio se tuvieron en cuenta las respuestas de los analitos y los valores de residuo seco, proporcionándole un peso de 10 a este último factor. En la Figura IV.25 se recogen las funciones de deseabilidad global para los tres factores estudiados, donde se puede ver que las condiciones óptimas se logran a niveles intermedios de relaciones muestra/soporte sólido (1:2), a cantidades intermedias-altas del adsorbente (2,5 a 4 g) y a niveles intermedios del disolvente (~12,5 mL). Por tanto, por razones prácticas se decide seleccionar 1,2 g de soporte sólido (sílice, relación 1:2 muestra/soporte sólido), 4 g de adsorbente (C₁₈) y 10 mL de disolvente (ACN), todo ello proporciona satisfactorios niveles de deseabilidad de 0,6.

2.2.3 Caracterización analítica del método

La validación del método se realiza mediante la evaluación de los blancos y efectos de matriz, y de los estudios de linealidad del equipo cromatográfico (Sección IV.1.1.2), precisión, exactitud junto con los valores de LODs y LOQs. A lo largo de esta sección se presentarán los resultados detallados de cada uno de ellos.

Estudio de blancos

Antes de comenzar se desarrolla un estudio de los blancos del procedimiento. Para ello se realizan inicialmente cuatro réplicas del proceso de MSPD, sin adición de la muestra, optimizado previamente a lo largo de la Sección IV.2.2.2 y que se muestra recogido a modo resumen en la Sección III.3.2. Para estas pruebas se adicionaron 10 ng g⁻¹ de ISs sobre el soporte sólido una vez situado en la jeringa y se deja evaporar el disolvente (15 min) antes de comenzar la elución. En esta primera prueba se detectaron cuatro analitos, ordenados

de mayor a menor concentración, MeP, *n*-PrP, EtP y *n*-BuP, donde se alcanzaron niveles de hasta 1,4 ng en el caso del MeP (“blanco inicial” en Tabla IV.11).

En consecuencia, se decidió realizar un estudio algo más exhaustivo de los diferentes agentes que pueden actuar como vía de entrada de los anteriores analitos: agente adsorbente (C_{18}), soporte sólido (sílice), disolvente (ACN), jeringa o cartucho donde se realiza la extracción y, aunque era bastante improbable, los ISs utilizados. Los dos primeros casos (C_{18} y sílice) se estudiaron analizando los extractos obtenidos tras una etapa previa de lavado de ambos materiales con aprox. 30 mL de ACN. La presencia de analitos en el disolvente utilizado se evaluó después de analizar los extractos obtenidos tras concentrar a sequedad 10 mL de ACN y reconstituyendo en 100 μ L de metanol. Los extractos procedentes de la exposición del cartucho al disolvente permiten el estudio de la presencia de estos analitos en el cartucho. Por último, con el objetivo de determinar los posibles blancos presentes en los ISs, se prepara un patrón de los mismos de 50 ng mL⁻¹ para su inyección directa en el equipo.

Tabla IV.11. Concentración (ng) de los analitos de interés (parabenes) presentes en los blancos.

ng g ⁻¹	MeP	Cl ₂ MeP	EtP	ClMeP	<i>i</i> -PrP	<i>n</i> -PrP	<i>i</i> -BuP	<i>n</i> -BuP	BzP
Blanco inicial	1,4	-	0,4	-	-	0,45	-	0,05	-
ACN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C_{18}	1,1	-	0,25	-	-	0,2	-	-	-
Cartucho	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sílice	0,4	-	0,05	-	-	0,2	-	0,015	-
IS	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los resultados (Tabla IV.11) muestran que tanto el C_{18} como la sílice, aunque principalmente el primero de ellos, son los principales responsables de la presencia de estos analitos en los blancos, demostrando la necesidad de realizar una etapa de lavado previa para intentar reducir al máximo la concentración de los mismos en ambos materiales. Se evaluaron diferentes protocolos: lavado exclusivamente con ACN, lavado con dos disolventes en serie (AcOEt y ACN) y por último combinar lavado (ACN) y sonicación (15 min). No se aprecian diferencias significativas entre los tres procedimientos de lavado, por tanto, se decide continuar esta investigación realizando los lavados previos tanto del adsorbente como del soporte sólido con ACN, logrando una la eliminación prácticamente total del EtP y del *n*-BuP, mientras que el MeP y el *n*-PrP se redujeron hasta 0,55 y 0,25 ng,

respectivamente. Varios autores también detectaron algunos de los analitos de este estudio en sus blancos [23,163].

Efectos de matriz

Al igual que se comenta en el resto de investigaciones, la presencia de materia orgánica y de otros compuestos presentes normalmente en la matriz de la muestra pueden originar efectos de matriz en el sistema LC-MS/MS, normalmente mediante la supresión de la señal, y particularmente cuando se emplea ESI como fuente de ionización.

Los efectos de matriz del sistema (%) fueron calculados de acuerdo con la Ecuación IV.4, determinándose la presencia o no del mismo mediante la proximidad al 100 %, puesto que ese valor es el correspondiente a un patrón con la misma concentración. Con lo que aquellas muestras que presenten efectos de matriz distantes al 100 %, ya sea por encima o por debajo, implicarían la presencia del mismo y sería más intenso cuanto mayor sea la distancia [754,755].

$$EM (\%) = 100 \times \frac{Respuesta_{muestra\ con\ adición} - Respuesta_{muestra\ sin\ adición}}{Respuesta_{patrón\ de\ misma\ concentración}}$$

Ecuación IV.4. Ecuación empleada para el cálculo de los efectos de matriz en el sistema (%).

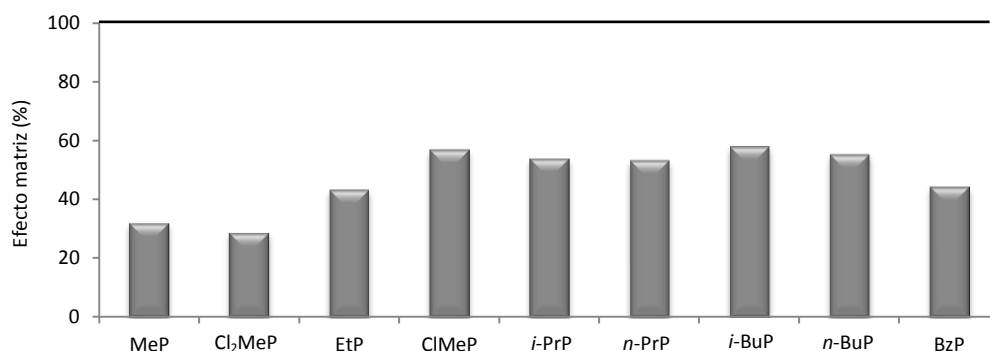


Figura IV.26. Efecto matriz (%) del sistema LC-MS/MS mediante MSPD de mejillón.

Estos efectos de matriz se estimaron mediante la diferencia entre la respuesta generada de una muestra (mejillón) extraída con el método recién desarrollado con adición

a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos sobre el extracto y otra sin adición, frente a un estándar con el mismo nivel de concentración. Se encontraron significativos efectos de matriz con valores inferiores a un 60 % (Figura IV.26) para todos los analitos, desde un 28,6 a un 58 % para el Cl_2MeP y el *i*-BuP, respectivamente. Sin embargo, los efectos de matriz del sistema se corrigen satisfactoriamente mediante la adición de los ISs (10 ng g^{-1}).

Tabla IV.12. Recuperaciones relativas para mejillón, almeja y berberecho, y LODs y LOQs (ng g^{-1}) referidos a dw y ww del método para parabenos.

COMPUESTO	% RECUPERACIÓN RELATIVA (RSD)				LOD ^c (dw)	LOD (ww)	LOQ ^d (dw)	LOQ (ww)
	MEJILLÓN ^a	MEJILLÓN ^b	ALMEJA	BERBERECHO				
MeP	-	78 (13)	84 (9)	98 (5)	0,43 ^e	0,086	1,43 ^f	0,286
Cl_2MeP	72 (5)	63 (3)	60 (15)	56 (10)	0,06	0,012	0,20	0,040
EtP	71 (7)	82 (15)	96 (21)	90 (2)	0,07	0,014	0,23	0,046
ClMeP	80 (4)	102 (19)	77 (4)	102 (3)	0,18	0,035	0,59	0,12
<i>i</i> -PrP	85 (3)	104 (13)	102 (16)	101 (2)	0,11	0,022	0,37	0,08
<i>n</i> -PrP	77 (2)	107 (15)	100 (16)	95 (4)	0,16 ^e	0,032	0,55 ^f	0,11
<i>i</i> -BuP	86 (6)	112 (13)	91 (16)	88 (5)	0,03	0,006	0,10	0,02
<i>n</i> -BuP	78 (5)	112 (12)	108 (8)	117 (5)	0,04	0,007	0,12	0,02
BzP	73 (3)	80 (11)	73 (12)	71 (5)	0,05	0,011	0,18	0,04

^a adición de 2 ng g^{-1} de analitos y 10 ng g^{-1} de IS

^b adición de 20 ng g^{-1} de analitos y 10 ng g^{-1} de IS

^c LODs calculado como 3 veces la S/N de un patrón (LOD=3·S/N)

^d LOQ calculado como 10 veces la S/N de un patrón (LOQ=10·S/N)

^e LOD calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco (LOD=3·SD)

^f LOQ calculado como 10 veces la desviación estándar del blanco (LOQ= 10·SD)

Exactitud y precisión

La exactitud del método analítico desarrollado se evalúa por medio del estudio de las recuperaciones obtenidas para cada analito en mejillones, aunque también se calcularon estos valores para otros moluscos como almeja y berberecho. Para ello, se realizan las extracciones por triplicado bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.2.2 y resumidas esquemáticamente en la Sección III.3.2. Normalmente, el estudio de la exactitud en muestras sólidas debería realizarse mediante el uso de CRM, sin embargo en el

caso de no disponer de este material y de acuerdo con la Decisión 2002/657/EC [756], pueden emplearse muestras fortificadas con los analitos de interés como posible alternativa a la hora de realizar el cálculo de la exactitud. Por tanto, en este caso se utilizan muestras de mejillón con 2 ng g^{-1} y 20 ng g^{-1} y muestras de almeja y berberecho con 20 ng g^{-1} de los analitos junto con 10 ng g^{-1} de los ISs (en todas las muestras), dejando reposar aproximadamente 30 min previos a la elución para la evaporación de los disolventes.

Las recuperaciones obtenidas tras la corrección con los respectivos ISs se recogen detalladamente en la Tabla IV.12. La recuperación del MeP no pudo ser calculada en las muestras con adiciones a bajo nivel debido a los valores superiores encontrados normalmente en este tipo de muestra ($\sim 7 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). Para el resto de los analitos se obtienen valores comprendidos entre, aproximadamente, un 71 y un 117 %, a excepción del Cl_2MeP con recuperaciones inferiores comprendidas entre un 56 y un 72 % aproximadamente. Este es el primer método desarrollado hasta la fecha que permite la determinación de los derivados clorados en muestras de biota, generando recuperaciones satisfactorias para el ClMeP ($\sim 100 \%$) pero valores inferiores para el Cl_2MeP ($\sim 63 \%$).

La precisión se expresada como RSD (%) y los resultados obtenidos se presentan recogidos en la Tabla IV.12. En ella se pueden apreciar valores de RSDs inferiores a 20 %, 21 % y 8 % en mejillón, almeja y berberecho, respectivamente, siendo este último el que proporciona mejores resultados. Estos valores, son similares a aquellos obtenidos para muestras de pescados [162,163]. Cabe destacar los satisfactorios resultados obtenidos para los derivados clorados principalmente en muestras de berberecho.

LODs y LOQs

Como punto final en la validación del método analítico desarrollado se procede a la determinación de los LODs y LOQs de cada uno de los analitos de interés. En este caso, se calcularán mediante dos procedimientos diferentes, por un lado, para el MeP y el $n\text{-PrP}$ que se encuentran todavía presentes en los blancos se calcularon como 3 o 10 veces el valor de la SD de esos analitos en el blanco, respectivamente (método *b* en Sección IV.1). Para el resto de los analitos, que no se encuentran presentes en los blancos se calculan asignando 3 o 10 veces la relación S/N de una muestra de mejillón con adición, respectivamente (método *a* en Sección IV.1), teniendo en cuenta la correspondiente correlación entre volumen y cantidad de muestra. En la Tabla IV.12 se recogen los diferentes LODs y LOQs calculados para los analitos referidos al peso seco, y posteriormente se extrapolaron a peso

húmedo, considerando un 80 % de humedad de media en las muestras frescas de moluscos, facilitando así la comparación con otros estudios de la bibliografía.

Los LODs obtenidos en peso seco se encuentran comprendidos entre 0,003 y 0,43 ng g^{-1} y los LOQs desde 0,10 a 1,43 ng g^{-1} . En cuanto a peso húmedo, los LOQs comprenden desde 0,02 hasta 0,29 ng g^{-1} . Los niveles obtenidos son comparables a los presentados para parabenes en muestras liofilizadas de muestras de pescados [162], a excepción del MeP donde los valores obtenidos en esta investigación (0,43 ng g^{-1}) son superiores a los obtenidos por Jakimska (0,04 ng g^{-1}), posiblemente como consecuencia de no considerar los blancos. Valores superiores fueron obtenidos por Emnet et al. [708] en almejas y erizos de mar con niveles comprendidos entre 1,1 y 2,1 ng g^{-1} ww para MeP, EtP, PrP y BuP, probablemente causado por la aplicación del método a un elevado y variado, en cuanto a su naturaleza, número de analitos. Kim et al. [163] obtuvieron niveles significativamente inferiores (0,001 a 0,015 ng g^{-1} lw) en muestras de pescados liofilizados empleando LC-MS/MS, calculados a partir de la desviación estándar del área del pico del análisis de blancos. En vista de la Figura 3 recogida en el artículo, estos últimos valores resultan algo sorprendentes puesto que se detectaron altos niveles de todos los parabenes y del triclosán en los blancos; desgraciadamente, no dan ningún tipo de explicación al respecto.

2.2.4 Aplicación a muestras reales

Como último punto de esta investigación, se aplica el método desarrollado a la determinación de los nueve parabenes, en diversas muestras de moluscos procedentes de diferentes puntos de las rías gallegas a lo largo del año 2012. Los detalles en cuanto al período de recolección y tipo de muestras empleadas en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.2.

La determinación de parabenes en las muestras de moluscos se realiza mediante extracciones por triplicado bajo las condiciones óptimas de extracción obtenidas a lo largo de la Sección IV.2.2.2 y que se presentan a modo resumen en la Sección III.3.2. Previo a la extracción, se les adicionó a cada una de las muestras de moluscos 10 ng g^{-1} de la disolución de ISs. En la Tabla IV.13 se presentan las diferentes concentraciones obtenidas en peso seco para cada uno de los analitos en las diferentes muestras. Las concentraciones en peso húmedo (Tabla IV.14) se calcularon mediante extrapolación, sabiendo el peso en fresco de las muestras de moluscos. Corroborando la información encontrada a lo largo de la bibliografía [27,757], el MeP es el analito que presenta mayores concentraciones encontrándose en todas las muestras analizadas, llegando a alcanzar niveles de hasta 7 ng

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

g^{-1} dw. Otro compuesto como el *n*-PrP se detecta en una única muestra (mejillón de batea) presentando valores de hasta $0,56 \text{ ng g}^{-1}$ dw. Por otro lado, analitos encontrados con menor frecuencia o a bajos niveles, como el EtP y *n*-BuP, se detectan en casi todas las muestras pero a concentraciones notablemente inferiores al MeP, por debajo de $0,37 \text{ ng g}^{-1}$ dw y a niveles no cuantificables, respectivamente.

Tabla IV.13. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} dw) de parabenes en muestras reales (n=3).

ng g^{-1}	MEJILLÓN BATEA	MEJILLÓN ROCA	ALMEJA 1	ALMEJA 2	BERBERECHO 1	BERBERECHO 2
MeP	7 ± 2	$2,4 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,3$	nc	$2,0 \pm 0,5$	$1,74 \pm 0,23$
Cl₂MeP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EtP	$0,27 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,1$	nc	nc	$0,37 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,1$
ClMeP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>i</i>-PrP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>n</i>-PrP	$0,56 \pm 0,01$	nc	nc	nc	nc	nc
<i>i</i>-BuP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>n</i>-BuP	nc	nc	nd	nc	nc	nc
BzP	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable (<LOD)

nc: no cuantificable (<LOQ)

Tabla IV.14. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} ww) de parabenes en muestras reales (n=3).

ng g^{-1}	MEJILLÓN BATEA	MEJILLÓN ROCA	ALMEJA 1	ALMEJA 2	BERBERECHO 1	BERBERECHO 2
MeP	$1,4 \pm 0,3$	$0,48 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,05$	nc	$0,39 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,05$
Cl₂MeP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
EtP	$0,054 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,02$	nc	nc	$0,07 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
ClMeP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>i</i>-PrP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>n</i>-PrP	$0,111 \pm 0,002$	nc	nc	nc	nc	nc
<i>i</i>-BuP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>n</i>-BuP	nc	nc	nd	nc	nc	nc
BzP	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable (<LOD)

nc: no cuantificable (<LOQ)

Hasta la fecha, son escasos los estudios centrados en la determinación de estos contaminantes en biota, siendo este el primer trabajo donde se determinan simultáneamente los parabenes más clásicos junto a algunos de sus derivados clorados en moluscos, por tanto se descarta realizar un estudio geográfico comparativo. Pese a ser escasos, un estudio reciente realizado con alguno de los parabenes clásicos en muestras de almejas muestra concentraciones similares y en algunos casos ligeramente superiores a las obtenidas en este estudio, principalmente para el *n*-PrP [708]. Realizando un estudio comparativo frente a otros organismos marinos como peces, se puede ver como los niveles de concentración detectados de MeP y *n*-PrP son similares e incluso superiores a los detectados por Jakimska et al. [162]. Por otro lado, el BzP no se encuentran en ninguna de las muestras de moluscos analizadas; sin embargo, se detectan niveles de $17,41 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ en muestras de pescados [162].

En la Figura IV.27 se presenta un cromatograma en el sistema LC-MS/MS de una muestra de mejillón de roca recogida en Octubre del año 2012.

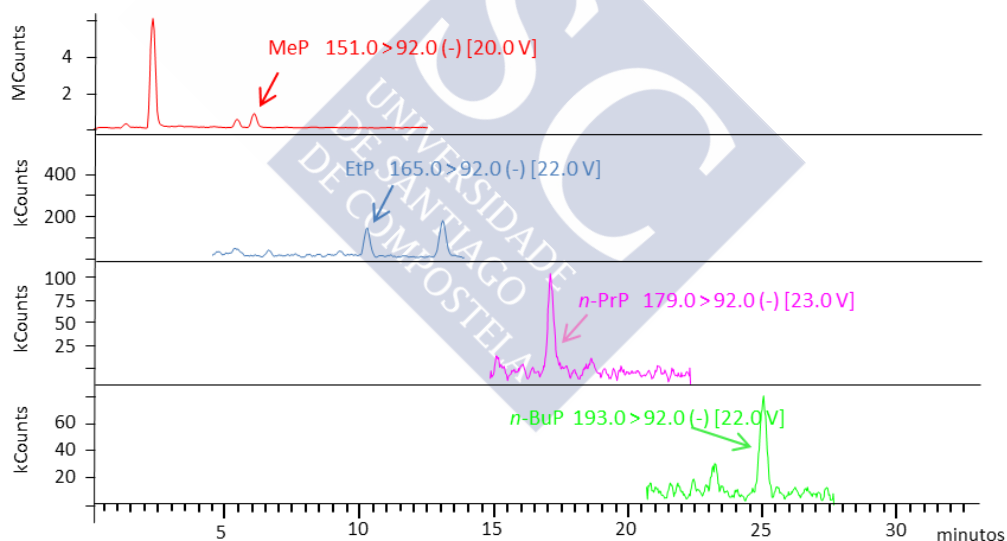


Figura IV.27. Cromatograma de muestra real de mejillón de roca de los analitos (parabenos) detectados mediante la inyección en el LC-MS/MS.



2.3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS EN AGUAS MEDIANTE AD/ABSORBENTES POLIMÉRICOS

2.3.1 Introducción y objetivos

Esta investigación centra su objetivo en el desarrollo de un método analítico que permita la detección simultánea de ocho PFASs en muestras de agua, tanto residual como superficial. Se emplea como método de preparación de muestra la extracción con ad/adsorbentes poliméricos de bajo coste. Esta técnica de microextracción proporciona una serie de importantes ventajas frente a otras técnicas más clásicas. De gran interés al tratarse de una técnica de gran simplicidad, con un consumo de disolventes orgánicos realmente bajo (~100 µL) y un menor coste global en comparación con otras técnicas de extracción, proporcionando al mismo tiempo una mayor selectividad en cuanto a la extracción de los analitos y en consecuencia originando extractos más limpios.

Finalmente, la determinación se efectuó mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ), ya que se trata de una técnica altamente sensible y selectiva, que permite efectuar una identificación inequívoca de todos los contaminantes analizados.

A modo de resumen, se recogen a continuación los objetivos del presente estudio:

- ✓ Optimización de las condiciones de extracción mediante la extracción con ad/absorbentes poliméricos: pH de la muestra, concentraciones de TBA, porcentaje de sal en muestra, volumen de muestra, tiempo de extracción, volumen del disolvente y selección del tiempo y modo de desorción.
- ✓ Validación del método: determinación de los efectos de matriz, linealidad, eficacia de extracción, exactitud, precisión y LODs y LOQs.
- ✓ Aplicación a muestras reales: agua de mar, río, ría e influentes de estaciones depuradoras de aguas urbanas.

2.3.2 Optimización de la técnica de extracción

En este estudio, se seleccionó inicialmente uno de los materiales poliméricos más empleados como es el PDMS, ampliamente utilizado para la extracción de compuestos orgánicos de muestras acuosas [128,598,758] y PES, un material que ha demostrado recientemente ser una buena alternativa al PDMS para la extracción de analitos de polaridad moderada-alta [597]. En primer lugar, se estudiaron algunos de los factores que más influencia pueden ejercer sobre la extracción de los analitos, como son el pH de la muestra, concentración de TBA (agente formador de par iónico), porcentaje de sal en la muestra, volumen de muestra, tiempo de extracción, volumen de disolvente de desorción y tiempo y modo de desorción.

Optimización de las condiciones de extracción

A. pH y concentración de TBA

Los compuestos ácidos como los PFASs se encuentran en forma aniónica a valores de pH neutros, sin embargo, el paso de fases acuosas a orgánicas y por tanto el aumento de la eficacia de extracción se ve favorecido al neutralizar las especies o analitos de interés. En este caso se seleccionan dos posibles mecanismos: a) mediante la formación de moléculas neutras modificando el pH de la muestra hacia niveles de pH ácidos, o b) mediante la formación de pares iónicos con carga neta neutra con la incorporación de un agente formador de pares iónicos como el TBA [206,295,312,759]. Por tanto, se realiza un estudio simultáneo del pH de la muestra y el volumen de TBA necesarios para evaluar y seleccionar el mecanismo de formación de especies neutras que presente mayores niveles de eficacia de extracción de los analitos de interés.

En este caso se decidió evaluar la influencia de estos dos parámetros con muestras de aguas residuales de influente, considerada como una de las muestras acuosas de mayor complejidad compuesta por una gran cantidad de compuestos interferentes que pueden competir con los analitos para lograr la formación del par iónico.

La extracción de los analitos se evaluó para los dos materiales poliméricos seleccionados (PES y PDMS), mediante un estudio por duplicado de cada una de las combinaciones entre los valores de pH de muestra y la concentración de TBA. Se introdujeron en el interior de un vial de vidrio transparente (22 mL) una barra de agitación magnética, 15 mL de una muestra de influente a cuatro niveles diferentes de pH (2, 4,5, 7 y 9,5, ajustado mediante adición controlada de disoluciones de HCl y NaOH), a los que se le

adicionan tres niveles de concentración de TBA (0, 28 y 56 mM). A continuación, se incorporaron los analitos de interés a una concentración en muestra de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ y la fibra (PES o PDMS), garantizando una completa inmersión de la misma. La etapa de extracción se realizó bajo agitación magnética constante de 500 rpm durante 14 horas. La desorción de los analitos se efectuó con $150 \mu\text{L}$ de metanol durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró la fibra y se inyectó la fracción de metanol (extracto) en el sistema cromatográfico.

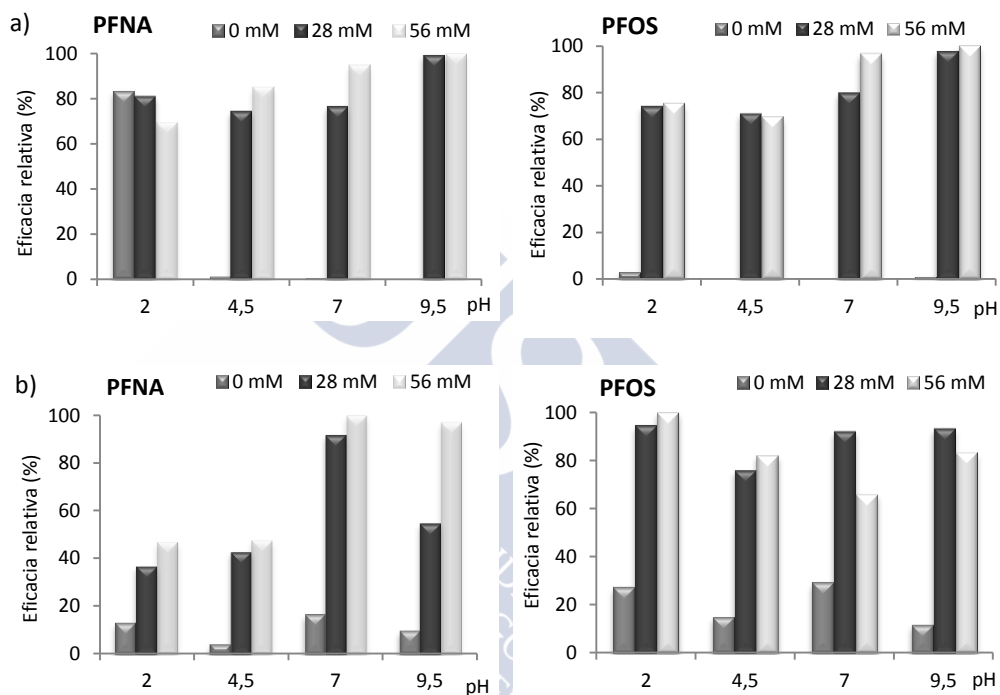


Figura IV.28. Eficacia relativa (%) para PFNA y PFOS con: a) PDMS y b) PES. Datos normalizados respecto al valor máximo de cada analito.

Los diferentes comportamientos de los analitos se presentan en la Figura IV.28, donde se recogen los resultados para cada tipo de fibra en base a la eficacia de relativa de extracción (%), donde se presenta un analito perteneciente a la familia de los PFCAs, como el PFNA, y otro analito que por sus diferencias estructurales puede presentar un comportamiento totalmente diferente (PFOS). Se aprecian diferentes comportamientos de los analitos frente al pH y concentración de TBA en función del tipo de polímero seleccionado. Empleando PDMS (Fig. IV.28.a), se puede realizar una extracción satisfactoria de los PFCAs mediante la acidificación de la muestra (pH 2) sin TBA, y también mediante la formación del par iónico a cualquier nivel de pH. Sin embargo, el PFOS presenta un

comportamiento diferente, pudiendo sólo ser extraído mediante la formación de par iónico y con resultados ligeramente superiores a pH elevados. Por otro lado, parece no ser importante la cantidad de TBA que se añada a la muestra, puesto que no se aprecian diferencias significativas entre ambas concentraciones. Este comportamiento no se parece en nada al que se genera al emplear el polímero de PES (Fig. IV.28.b), en donde se puede ver que no se logra una extracción satisfactoria en ausencia de TBA, incluso a pHs ácidos. Además, en el caso de los PFCAs se consiguen mejores extracciones a niveles elevados de pHs. Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos, se decide seleccionar como niveles óptimos un valor de pH de 9,5 y elevadas concentraciones de TBA (56 mM) para ambos tipos de fibras.

B. Efecto de la fuerza iónica

Continuando con la optimización de los diferentes parámetros que pueden afectar a la extracción de los analitos, se procede al estudio de la fuerza iónica de la muestra mediante la adición de una sal como es el NaCl. En este ensayo los niveles de NaCl estudiados fueron de 0, 10 y 30 % (peso/volumen).

En este ensayo se realizan las extracciones por duplicado con 15 mL de muestras de agua Milli-Q ajustando su pH a 9,5 mediante una adición controlada con NaOH (1 M). Se introducen inicialmente 15 mL de la muestra junto con la cantidad necesaria de TBA, para obtener en muestra 56 mM, y las cantidades correspondientes de sal equivalentes a los porcentajes de sal seleccionados. Junto a ello se añade también una barra de agitación magnética y los analitos de interés con concentración en muestra de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. La extracción se realiza bajo agitación magnética a 500 rpm durante 14 horas, y la desorción de los analitos se lleva a cabo en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos con 150 μL de metanol.

La Figura IV.29 recoge los diferentes resultados obtenidos para los diferentes porcentajes de sal adicionados a la muestra en función del tipo de material extractante utilizado. Se aprecian diferentes comportamientos en función de la longitud de la cadena fluorocarbonada. En el primero de los casos, con PDMS como material extractante, se puede apreciar cómo la presencia de sal afecta de forma negativa a la extracción para compuestos de cadena larga (C9 - C12), mientras que los niveles máximos de sal son los que proporcionan los mejores resultados para los de cadena corta (C6 y C7). En el caso de los analitos de cadena intermedia, como pueden ser PFOS y PFOA, los mejores resultados se obtienen al utilizar niveles del 10 % de NaCl en las muestras. Por tanto, en base a los

resultados se seleccionó como valor óptimo para la extracción simultánea de todos los analitos mediante PDMS las condiciones intermedias correspondientes al 10 % de NaCl.

Por otro lado, se observa un comportamiento ligeramente diferente de los analitos de cadena corta al ser extraídos con PES. En este caso, no se presencia una clara tendencia al incrementar el porcentaje de sal para los analitos de cadena corta (C6 - C8). Sin embargo, el comportamiento para los de cadena larga (C9 - C12) es el mismo que con el PDMS, empeora la extracción con el aumento de la cantidad de sal. Por tanto, en este caso se decidió seleccionar como condición óptima de extracción con PES la no adición de sal en muestra.

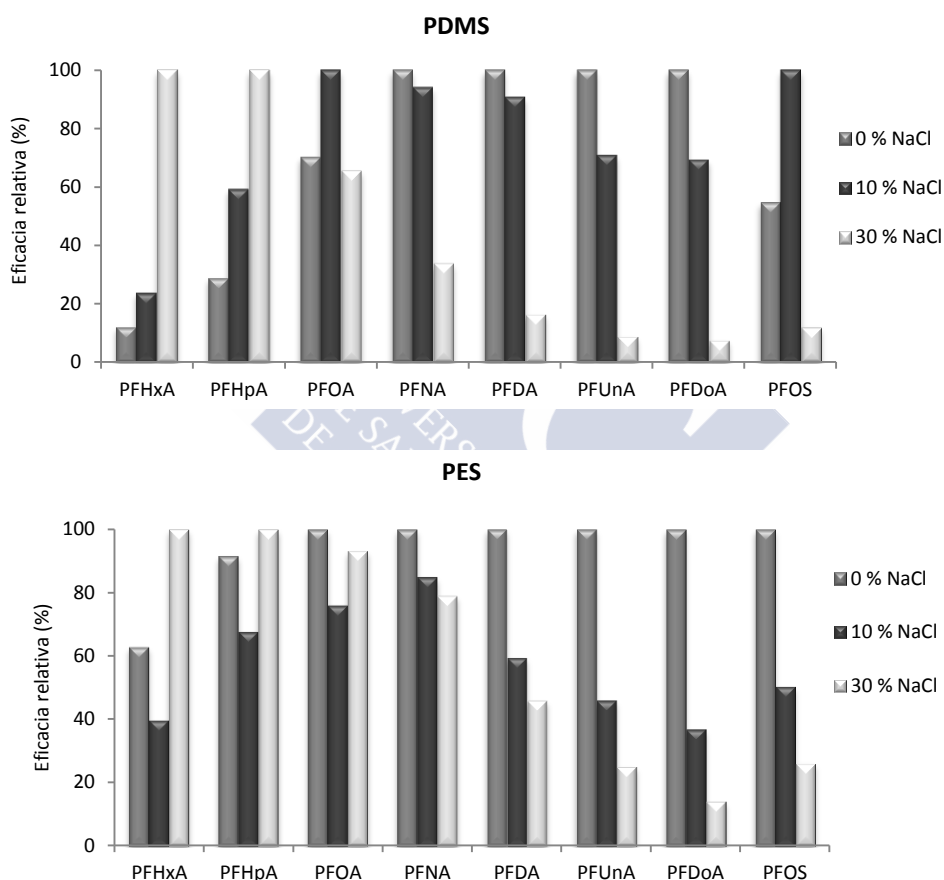


Figura IV.29. Eficacia relativa (%) de los PFASs con diferentes porcentajes de NaCl en el estudio de la fuerza iónica empleando PDMS (superior) y PES (inferior). Datos normalizados con respecto al valor máximo de cada analito.

C. Volumen de muestra

Otro de los factores a tener en cuenta a la hora de realizar la extracción con ab/adsorbentes poliméricos es el volumen de muestra. Con este fin, se realiza un estudio para evaluar este factor a tres diferentes niveles (8, 18 y 100 mL), de acuerdo con los volúmenes típicos que presentan los viales de vidrio de espacio de cabeza (10, 22 y 120 mL).

Estos experimentos se llevaron a cabo con muestras de agua Milli-Q a una concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de analitos ajustando el pH de la muestra a 9,5. Antes de nada se deben introducir en el interior de los viales las cantidades de sal optimizadas en la sección anterior (efecto de fuerza iónica) para cada material (10 % para PDMS y 0 % para PES) y el volumen de TBA necesario (56 mM) optimizado en la primera sección (pH y concentración de TBA). A continuación, se introduce la barra magnética y el correspondiente material extractante.

La etapa de extracción se realiza, como en los casos anteriores, bajo agitación magnética a 500 rpm durante 14 horas. Una vez finalizada, se sitúa en un inserto el material extractante junto con 150 μL de metanol empleado como disolvente de desorción, procediendo de este modo a la desorción de los analitos en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Los resultados para esta prueba se expresan en función de los factores de concentración de los analitos en el material polimérico (Figura IV.30), calculados de acuerdo a la Ecuación 2. Empleando como material extractante PDMS se aprecia claramente cómo se logran factores de concentración más elevados al emplear mayores volúmenes de muestra, sobre todo para los analitos más apolares, no obstante, para los analitos más polares (C6 y C7) la diferencia no es significativa. Se puede decir que, a modo general, se obtienen mayores factores de concentración para los analitos de cadena larga. Por otro lado, empleando PES como material extractante, parece que los analitos más polares (C6 - C8) muestran una diferencia apreciable sobre el factor de concentración al incrementar el volumen de muestra. No obstante, en este caso, los analitos de cadena larga no experimentan un aumento en el factor de concentración al emplear volúmenes de muestra superiores a 18 mL. Esto puede ser debido al hecho de que incluso tras 14 horas de extracción los analitos más hidrofóbicos (más apolares) no hayan logrado todavía alcanzar el equilibrio o a un aumento en la adsorción de estos compuestos en las paredes de estos viales de mayor tamaño (120 mL).

Finalmente, se decidió seleccionar 100 mL como volumen de muestra para los dos materiales poliméricos.

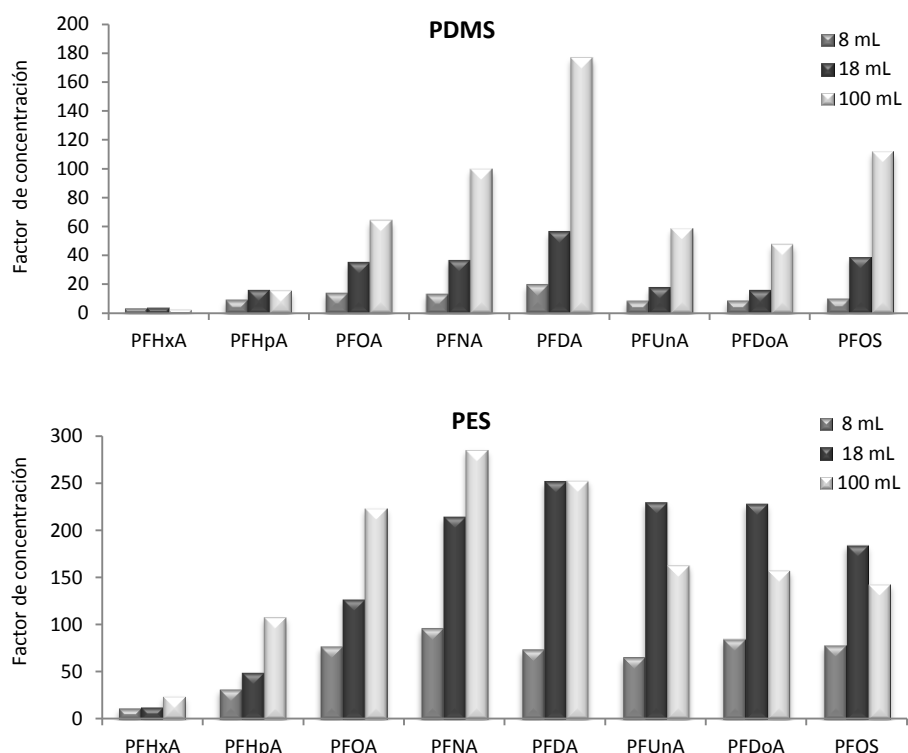


Figura IV.30. Factores de concentración obtenidos para PDMS (superior) y PES (inferior) durante la optimización del volumen de muestra.

D. Tiempo de extracción

Continuando con la optimización de los diferentes parámetros que pueden afectar a la etapa de extracción, se realizó un estudio del tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio en el proceso de extracción con ab/adsorbentes poliméricos.

La extracción se realizó por duplicado con muestras de 100 mL de agua Milli-Q con un pH ajustado de 9,5 y 56 mM de TBA en muestra, añadiendo un 10 % de NaCl en la extracción realizada con PDMS y en ausencia de sal para la realizada con PES. Los analitos se adicionaron sobre la muestra a una concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Los tiempos de extracción evaluados son 30 min, 1, 2, 4, 8 horas y toda la noche (14 horas), manteniendo la agitación magnética constante a 500 rpm a temperatura ambiente. La etapa de desorción se desarrolló igual que en los casos previos, empleando 150 μL de metanol y bajo sonicación en un baño de ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente.

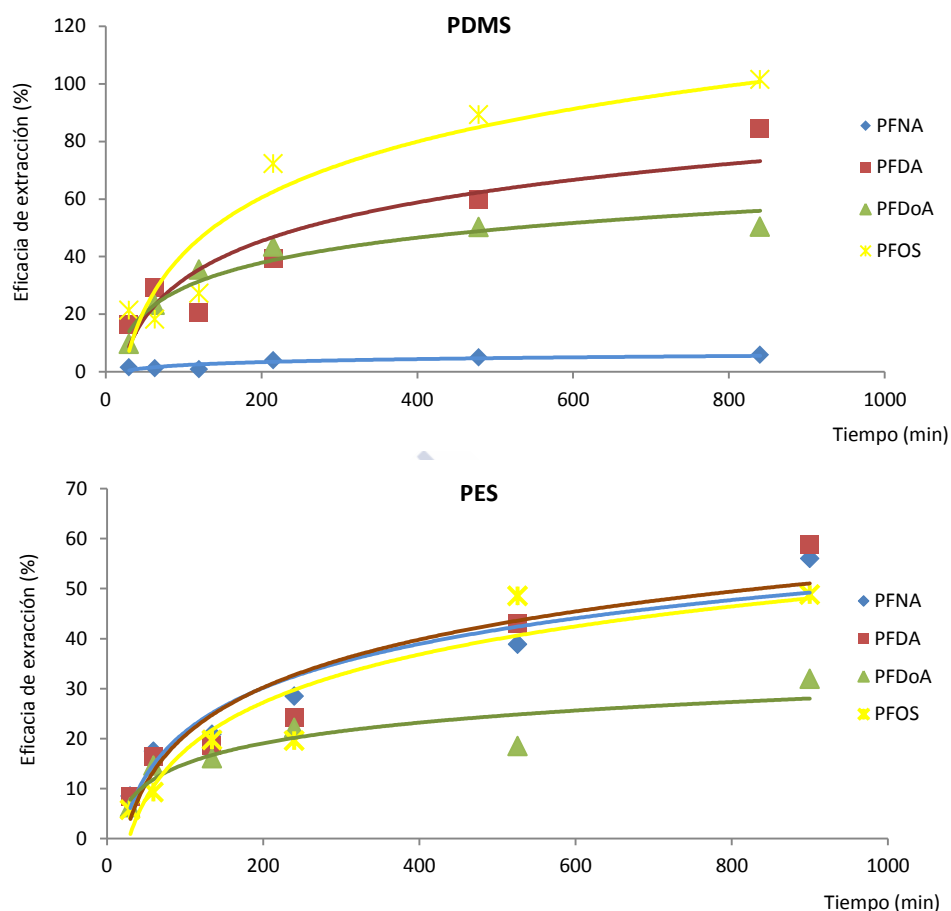


Figura IV.31. Representación de las cinéticas de extracción para PFNA, PFDA, PFDoA y PFOS empleando PDMS (superior) y PES (inferior) como material polimérico extractante.

Tal y como se muestra en las cinéticas de extracción recogidas en la Figura IV.31 para algunos analitos, no se logra alcanzar el equilibrio de extracción con ninguno de los dos materiales extractantes, ni tan siquiera tras 14 horas de extracción. Por tanto, por razones prácticas, se decidió mantener las muestras bajo agitación magnética durante toda la noche (~14 horas) con ambos tipos de fibras. Aunque el tiempo de extracción resulte prolongado en comparación con otras técnicas de extracción, presenta la ventaja de poder realizar simultáneamente las extracciones de varias muestras gracias al agitador magnético multiposicional (ej. 15 a 60 posiciones). Por otro lado, se podría reducir el tiempo de extracción siempre que no se requieran alcanzar LODs excesivamente bajos.

Optimización de las condiciones de desorción

A. Volumen del disolvente

Tras optimizar los diferentes parámetros que pueden afectar a la extracción de los analitos, se continúa con la optimización de la etapa de desorción para lograr extraer del material polimérico la mayor parte de los analitos extraídos previamente. El primero de los parámetros a optimizar es el volumen de disolvente (metanol) necesario para realizar la desorción.

Para ello, se realizaron extracciones por triplicado de muestras de agua Milli-Q con adición de los analitos sobre la muestra a concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, bajo las condiciones de extracción recogidas a lo largo de toda la sección anterior (optimización de las condiciones de extracción) presentadas de forma esquemática en la Sección III.3.3 con ambos tipos de materiales poliméricos. En cuanto a la etapa de desorción, se efectúan tres desorciones consecutivas con tres fracciones de $100 \mu\text{L}$ de metanol permaneciendo durante 15 min en un baño de ultrasonidos. Se escogieron fracciones de $100 \mu\text{L}$ puesto que es el volumen mínimo capaz de cubrir el material ab/adsorbente en su totalidad.

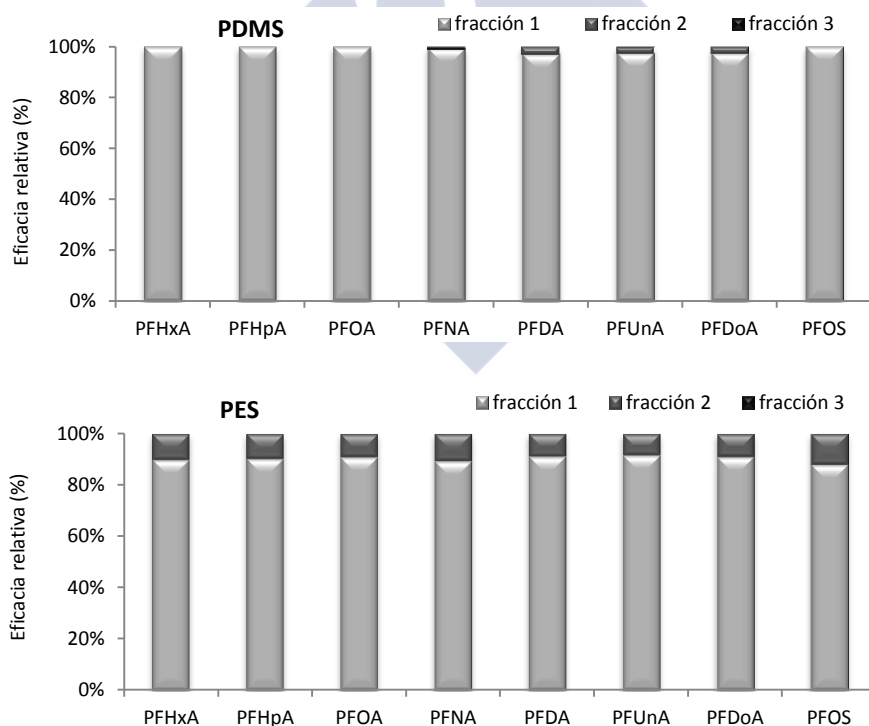


Figura IV.32. Eficacia relativa (%) de los analitos (PFASs) desorbidos por fracción de $100 \mu\text{L}$ de metanol empleando PDMS (superior) y PES (inferior).

Los resultados obtenidos para ambos tipos de materiales PES y PDMS aparecen recogidas en la Figura IV.32. Por un lado, se aprecia cómo una única fracción de 100 μL de metanol logra desorber todos los analitos del material de PDMS, incluso obteniendo buenos resultados para los analitos más polares. Sin embargo, en el caso de las extracciones realizadas con PES se consigue desorber hasta un 90 % de los analitos con la primera fracción de 100 μL de metanol, quedando desorbidos en su totalidad con la segunda fracción. Ciertamente es que con esta segunda fracción se consigue desorber un 10 % más, sin embargo, un mayor volumen final (pasando de 100 μL a 200 μL) conllevaría a un incremento de los LODs y por tanto un empeoramiento de la sensibilidad de los analitos en el equipo. Finalmente, en base a las anteriores conclusiones se decide continuar con sólo 100 μL de metanol como volumen de desorción para ambos tipos de materiales poliméricos.

B. Tiempo de desorción y técnicas de desorción auxiliares

Concluyendo con las pruebas de optimización de los parámetros que pueden afectar a esta técnica de extracción, se estudia el tiempo de desorción y la necesidad de utilizar o no un mecanismo auxiliar que permita minimizar el tiempo de desorción. Según lo recogido en la bibliografía, los tiempos requeridos para realizar una desorción con disolventes no suelen ser superiores a 15 minutos y los mecanismos adicionales para agilizar el proceso suelen ser mediante agitación, aplicación de temperatura (50 - 70 $^{\circ}\text{C}$) o sonicación [603,614]. En base a eso, se decide efectuar un estudio combinado, mediante la extracción por duplicado de muestras de agua Milli-Q (1 $\mu\text{g L}^{-1}$ adición de analitos en muestra) con las condiciones de extracción optimizadas previamente (Sección III.3.3), entre tiempos de desorción de 5, 10 y 15 min, junto con el uso o no de un baño de ultrasonidos a 25 $^{\circ}\text{C}$ como mecanismo auxiliar.

La Figura IV.33 y Figura IV.34 recogen los diferentes resultados obtenidos para las combinaciones entre tiempos de desorción y la necesidad o no de efectuar un mecanismo auxiliar de sonicación. Se presentan los resultados para el PFUnA, como representativo de los PFCAs, y para el PFOS por presentar diferente configuración estructural y por tanto con la posibilidad de presentar un comportamiento diferente frente a los PFCAs, tanto para la extracción realizada con PDMS (Fig. IV.33) como para la realizada con PES (Fig. IV.34). Para el caso de extracciones con PDMS (Fig. IV.33) apenas se aprecian diferencias entre emplear el baño de ultrasonidos o no para tiempos superiores a 10 min. Por tanto, para simplificar el proceso se decide prescindir de este mecanismo. Por otro lado, no se aprecian diferencias

significativas para los PFCAs con respecto a los tiempos de desorción, pero parece que para el PFOS con tan solo 5 minutos serían suficientes. En el caso de las extracciones empleando PES (Fig. IV.34) se obtienen mejores resultados para todos los PFCAs si la desorción se realiza sin sonicación. Por otro lado, 5 min de desorción parecen ser suficientes para lograr una buena desorción. Sin embargo, se decidió seleccionar para ambos materiales 10 min como tiempo final de desorción para asegurar una buena reproducibilidad en esta etapa.

Finalmente, la desorción se realizará con 100 μ L de metanol durante 10 min a temperatura ambiente sin sonicación tanto para PES como para PDMS. No se consideró una posterior etapa de concentración del extracto, puesto que se demostró que la evaporación se considera una etapa crítica caracterizada por pérdidas importantes de los analitos [760].

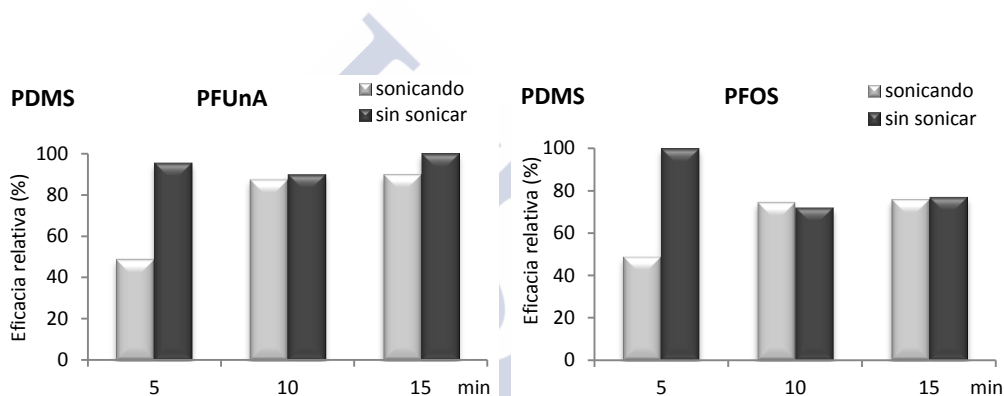


Figura IV.33. Eficacia relativa de desorción (%) de PFUnA y PFOS empleando PDMS evaluando tiempos de desorción y ausencia o no de método de sonicación auxiliar.

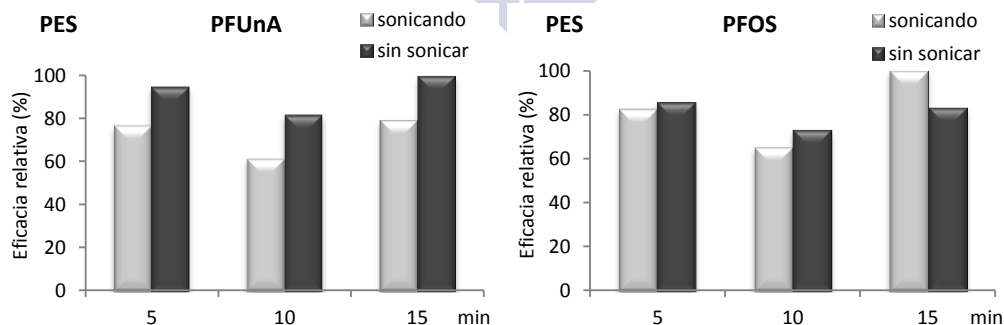


Figura IV.34. Eficacia relativa de desorción (%) de PFUnA y PFOS empleando PES evaluando tiempos de desorción y ausencia o no de método de sonicación auxiliar.

2.3.3 Caracterización analítica del método

A continuación, se realiza la validación del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos de bajo coste seguido de determinación mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).

Antes de comenzar, se realiza un estudio comparativo entre los dos tipos de materiales poliméricos empleados como material extractante seleccionando de este modo el más adecuado para realizar la extracción de los analitos de interés y, por tanto, proceder a la validación del método con la fibra seleccionada.

Al igual que en las anteriores investigaciones, la validación del método desarrollado se presentará mediante estudios de linealidad, precisión, eficacia de extracción y mediante los valores de LODs y LOQs. A lo largo de esta sección se presentarán los estudios detallados de cada uno de ellos.

Efectos de matriz

A. LC-MS/MS

Uno de los principales inconvenientes de la técnica de LC-MS/MS con API, es la supresión de la señal que tiene lugar durante el proceso de ionización debido a los componentes presentes en la matriz de la muestra. En ESI, se cree que estos componentes compiten con los analitos en su acceso a la superficie de las microgotas cargadas, dificultando su ionización y/o su desolvatación.

Es necesario comprobar estos efectos para los dos tipos de materiales poliméricos estudiados, ya que en base a su distinta composición, la ad/absorción de otros solutos presentes en la matriz puede ser mayor o menor e influir más o menos en los procesos de ionización en el LC-MS/MS.

Para estimar los efectos de matriz en el sistema LC-MS/MS se compararon los resultados obtenidos en la extracción por triplicado mediante ad/absorbentes poliméricos de muestras de efluente, influente, río y mar, frente a un extracto de agua Milli-Q, todos ellos con adición de patrones a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ en el extracto, tras el procedimiento total de la extracción. Al mismo tiempo se realizan también extracciones de las muestras sin adición de los analitos para su posterior comparación y cálculo de los efectos de matriz.

Los efectos de matriz (%) fueron calculados de acuerdo con la Ecuación 4. El procedimiento de extracción y desorción se efectuó por triplicado bajo las condiciones optimizadas previamente (Sección IV.2.3.2).

En base a lo comentado anteriormente, se puede ver por medio de la Figura IV.35 cómo apenas existen efectos de matriz en la ionización en el LC-MS/MS para la extracción realizada con PDMS y PES. Las pequeñas desviaciones son debidas principalmente a la variabilidad de los resultados. Esto demuestra, al igual que para otras técnicas de equilibrio [761,762], que la extracción por ad/absorción proporciona extractos más limpios que algunas de las técnicas clásicas, como SPE o LLE.

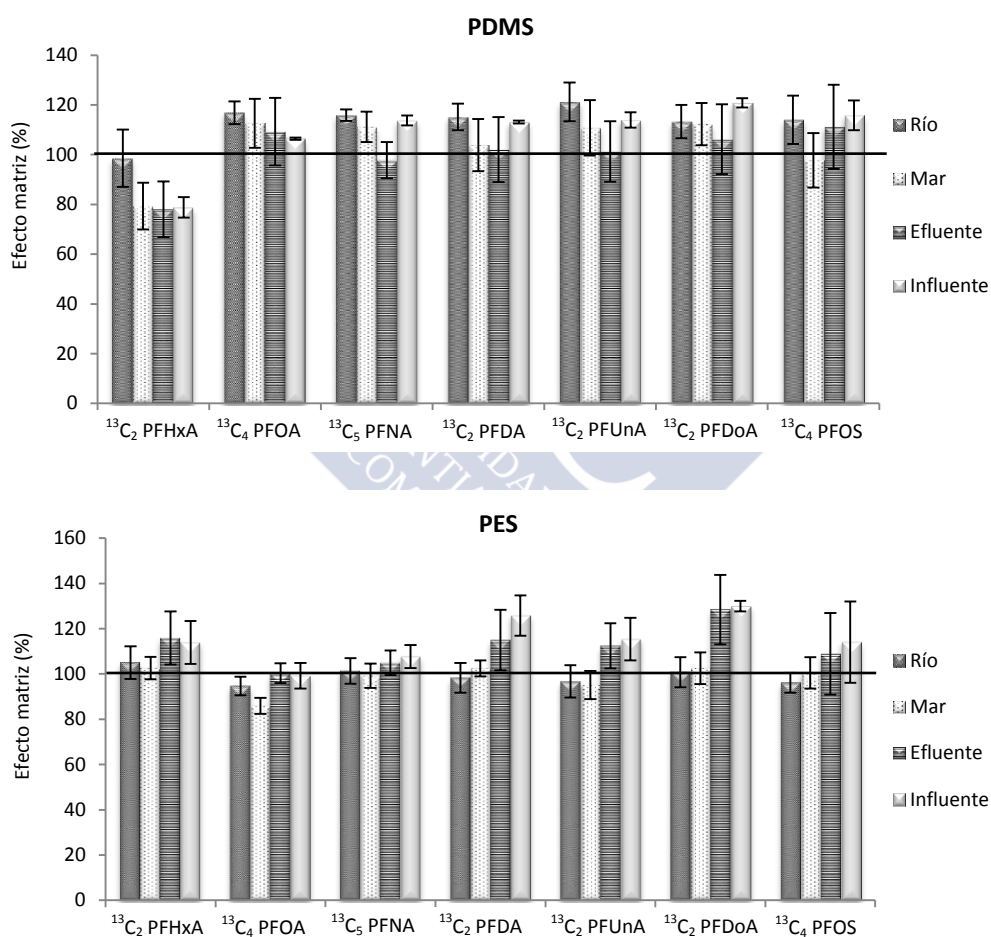


Figura IV.35. Efecto matriz (%) en la determinación mediante LC-MS/MS para PDMS (superior) y PES (inferior).

B. Extracción

La eficacia de la extracción para los procesos de extracción mediante ab/adsorción también puede verse influenciada por la composición de la matriz de la muestra. La materia orgánica, ya sea disuelta o en suspensión, que se encuentra contenida en las muestras acuosas puede competir con el material ad/absorbente por los analitos y, por tanto, en función de la materia orgánica contenida, la eficacia de extracción puede variar con el tipo de muestra.

Los efectos de matriz en el proceso de extracción con ad/absorbentes poliméricos se evaluaron para cuatro tipos de aguas diferentes: mar, río, efluente e influente. Con el fin de estimar los efectos de matriz se compararon los resultados obtenidos en la extracción de las cuatro muestras anteriores frente a las obtenidas tras la extracción de la muestra de agua Milli-Q, todas ellas con adición de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos sobre la muestra antes de comenzar la extracción. En este caso se vuelven a hacer las extracciones de las mismas muestras sin adición de analitos para los cuatro tipos de aguas, obteniendo así, mediante comparación, las áreas de los picos correspondientes a la adición de los analitos. La diferencia principal entre ellas es la cantidad de materia orgánica que contienen sabiendo que, en muchos casos, es la principal responsable de las diferencias en el proceso de extracción. En este caso, también es necesaria la evaluación de los efectos de matriz en la extracción con los dos tipos de materiales poliméricos, determinando la presencia o no de efectos de matriz en función de la desviación con respecto al 100 % de este factor, empleando para el cálculo del mismo la Ecuación 3.

El procedimiento de extracción de las cinco muestras se efectuó por triplicado bajo las condiciones optimizadas y recogidas en la a lo largo de la Sección IV.2.3.2.

Tal y como se muestra en las dos gráficas presentadas en la Figura IV.36, existen efectos matriz para todos los tipos de muestras analizados, indistintamente del material polimérico empleado para la extracción. En ambos casos, los efectos de matriz más destacables se obtuvieron para las muestras de influente por su alto contenido en materia orgánica. Para el resto de las muestras, parece que el PDMS resulta más sensible a los efectos de matriz. De cualquier modo, la precisión y la exactitud no se ven apenas afectadas por la composición de la muestra puesto que se encuentran disponibles los IS marcados isotópicamente para prácticamente todos los analitos del estudio, compensando los efectos de matriz y proporcionando buenos resultados en la validación del método.

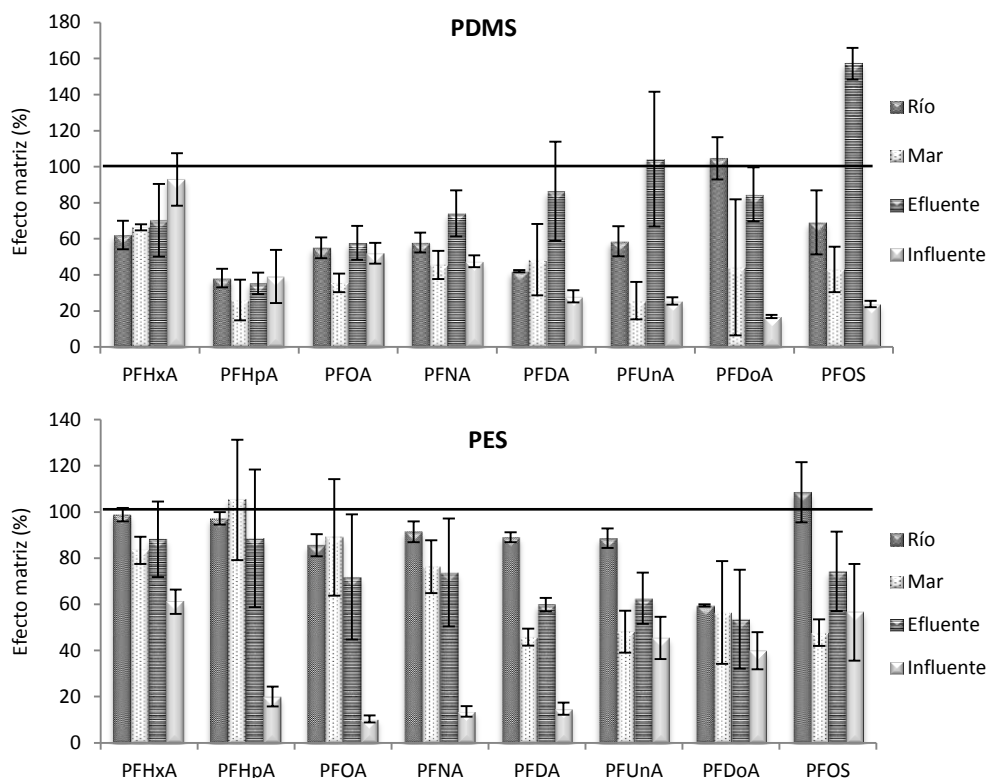


Figura IV.36. Efecto matriz (%) del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos realizando la determinación mediante LC-MS/MS para PDMS (superior) y PES (inferior).

Comparación de los materiales extractantes

La selección del material extractante más adecuado para la extracción de los PFASs se llevará a cabo mediante un estudio comparativo entre ambos materiales, teniendo en cuenta los resultados obtenidos tras la evaluación de las eficacias de extracción obtenidas y la evaluación de los LODs y LOQs.

A. Eficacia de extracción

El primer ensayo se realiza para evaluar la eficacia de extracción de cada material realizando un estudio comparativo entre las áreas de los picos de los compuestos extraídos en el LC-MS/MS de una muestra de agua Milli-Q ($n=2$) con una concentración en muestra de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos frente a un patrón estándar con el mismo nivel de concentración

preparado en metanol. Las condiciones de extracción empleadas son las optimizadas previamente a lo largo de la Sección IV.2.3.2.

Con el fin de mejorar la comprensión, se presentan a continuación recogidos en forma gráfica (Figura IV.37) las eficacias de extracción obtenidas para cada uno de los polímeros, junto con los valores exactos recogidos posteriormente en la Tabla IV.16, a modo de futuras comparaciones, las diferentes eficacias de extracción obtenidas para ambos materiales poliméricos. Se puede apreciar claramente cómo las eficacias de extracción son similares para ambos materiales para los analitos de cadena larga (C10 - C12, 37 - 55 %) y algo superior la extracción con PDMS para el caso del PFOS. Sin embargo, los resultados para los analitos más polares (C6 - C9) son bastante diferentes, apreciándose claramente mejores eficacias de extracción cuando se emplea PES como material extractante, con valores de entre 5 y 74 %, mientras que sólo se logra entre un 0,2 y 7 % al emplear PDMS.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de las eficacias de extracción obtenidas con ambos materiales se puede concluir con que el material polimérico PES proporciona resultados más satisfactorios para la extracción de PFASs en aguas, principalmente para los PFCAs más polares.

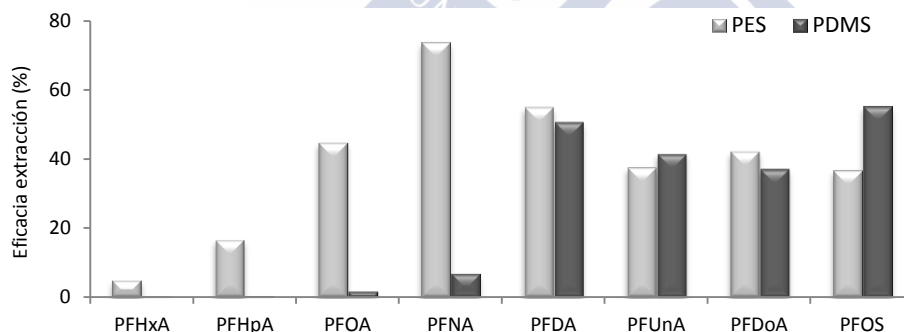


Figura IV.37. Eficacia de extracción (%) del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos realizando la determinación mediante LC-MS/MS para los PFASs en función del tipo de material extractante (PES frente PDMS).

B. LODs, LOQs y blancos de extracción

Continuando con el estudio de algunos parámetros para determinar el ad/absorbente de extracción óptimo para la metodología desarrollada, se procede a la evaluación de los LODs y LOQs generados con ambos materiales.

Estos factores (LODs y LOQs) se evaluaron, tras confirmar la ausencia de blancos de extracción, a partir de muestras de agua Milli-Q para los niveles más bajos del calibrado (método *a* en Sección IV.1), estableciendo los LODs como 3 veces el valor de la S/N ($LOD = 3 \cdot S/N$) y los LOQs como 10 veces ese valor ($LOD = 10 \cdot S/N$). En la Tabla IV.15 (y posteriormente a modo resumen para PES en la Tabla IV.16) aparecen recogidos los diferentes LODs obtenidos para la extracción con cada uno de los polímeros. Especial interés se le confiere a los niveles presentados para los analitos de mayor polaridad (C6 y C7) tras ser extraídos con la fibra de PDMS con valores de LODs superiores a 100 ng L⁻¹, corroborando los resultados obtenidos de la eficacia de extracción con este material. Sin embargo, se aprecia un comportamiento claramente diferente al emplear PES, obteniendo LODs satisfactorios para todos los analitos comprendidos entre 0,2 y 20 ng L⁻¹, y en particular para los analitos de cadena larga (C8 - C12) con LODs inferiores a 1 ng L⁻¹.

Tabla IV.15. LODs y LOQs (ng L⁻¹) del método analítico de extracción con ad/absorbentes poliméricos seguido de determinación mediante LC-MS/MS para PFASs.

ng L ⁻¹	LODs		LOQs	
	PDMS	PES	PDMS	PES
PFHxA	250	20	833	67
PFHpA	100	10	333	33
PFOA	6	0,5	20	1,5
PFNA	4	0,6	13	2
PFDA	2	0,4	6	1,4
PFUnA	3	1	9	3
PFDoA	3	0,2	10	0,6
PFOS	6	3	20	10

Estos valores de LODs obtenidos con volúmenes de muestra de 100 mL son comparables a aquellos a los generados por algunas técnicas como LLE [513] o SPE [288,530,534,763], que emplean volúmenes de muestra comprendidos entre 40 y 900 mL. Se obtienen LODs superiores, entre 50 y 2.500 ng L⁻¹, al emplear otras técnicas como SPME con volúmenes de muestra de 5 mL [312]. Sin embargo, si se requieren alcanzar niveles de ultra traza (inferiores a pg L⁻¹) no se podría aplicar ninguno de estos métodos, quedando como alternativa el uso de los procedimientos de SPE con grandes volúmenes de muestra [296,764].

C. Conclusión

Finalmente, en base a los resultados obtenidos en cuanto a eficacia de extracción y LODs y LOQs del método desarrollado para ambos materiales poliméricos, se decide seleccionar uno de ellos para continuar con la validación del método analítico y su posterior aplicación a muestras reales con la finalidad de poder determinar la concentración de los PFASs de estudio en las mismas.

Recapitulando un poco los resultados obtenidos en estas dos pruebas, se puede ver cómo el PDMS proporciona menores eficacias de extracción, principalmente para aquellos analitos más polares (C6 - C9) con niveles inferiores a un 7 %, mientras que los niveles generados con PES para esos analitos son significativamente más elevados, entre un 5 y un 74 %. Teniendo también en cuenta los LODs obtenidos con ambos polímeros, se decide descartar el uso de PDMS como material extractante como consecuencia de los elevados LODs obtenidos para los analitos más polares (PFHxA y PFHpA), mientras que PES genera resultados satisfactorios incluso para los analitos de menor tamaño de cadena. Finalmente y correspondiendo con lo recogido anteriormente, se decide seleccionar el material polimérico PES para la determinación de PFASs en muestras reales.

Linealidad

El estudio de la linealidad en la respuesta analítica se evaluó mediante la extracción por duplicado de muestras de agua Milli-Q, adicionando concentraciones conocidas de los PFASs a ocho diferentes niveles: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1.000 ng L⁻¹. El procedimiento de extracción utiliza PES como material extractante y sigue el protocolo optimizado previamente para esta fibra presentado de forma esquemática en la Figura III.4. La calibración se llevó a cabo mediante el método del ISs, empleando los correspondientes patrones marcados isotópicamente a un nivel de 200 ng L⁻¹.

Los resultados de las calibraciones para cada uno de los compuestos se recogen detalladamente en la Tabla IV.16. Se puede apreciar cómo los analitos presentan una respuesta lineal con R² superiores a 0,9829 para todos los analitos.

Tabla IV.16. Parámetros de las rectas de calibrado, eficacia de extracción, repetibilidad (RDS (%)), recuperaciones relativas, LODs y LOQs (ng L^{-1}) para el método de extracción con adsorbentes poliméricos (PES) seguido de determinación mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).

COMP.	CALIBRADO CON PATRÓN INTERNO	% EFICACIA EXTRACCIÓN	F.C.	RSD (%)		% RECUPERACIÓN RELATIVA (RSD)		LODs (ng L^{-1})	LOQs (ng L^{-1})
				100 ng L^{-1}	1.000 ng L^{-1}	MAR	INFL.		
PFHxA	$y=0,001x+0,782$ $R^2: 0,9906$	5,0	25	11,2	8,8	93 (3)	97 (8)	20	67
PFHpA	$y=0,002x+0,138$ $R^2: 0,9829$	16,7	108	6,1	3,0	105 (7)	103 (12)	10	33
PFOA	$y=0,007x+0,090$ $R^2: 0,9847$	44,8	224	10,7	7,4	89 (7)	85 (6)	0,5	1,5
PFNA	$y=0,005x+0,026$ $R^2: 0,9957$	73,8	286	4,0	2,7	91 (5)	86 (15)	0,6	2
PFDA	$y=0,009x+0,104$ $R^2: 0,9992$	55,1	253	4,4	5,2	89 (6)	88 (11)	0,4	1,4
PFUnA	$y=0,005x+0,098$ $R^2: 0,9932$	37,6	163	9,4	5,9	89 (4)	92 (9)	1	3
PFDoA	$y=0,004x+0,209$ $R^2: 0,9947$	42,3	158	15,3	7,4	88 (9)	87 (13)	0,2	0,6
PFOS	$y=0,003x+0,232$ $R^2: 0,9957$	36,9	143	8,7	5,9	108 (3)	94 (7)	3	10

Precisión

La precisión se estudió por medio del estudio de la repetibilidad, expresada como RSD (%), mediante la extracción simultánea de cinco muestras de agua Milli-Q con adiciones de los analitos a dos niveles, 100 y 1.000 ng L^{-1} , y con adición de los ISs a 200 ng L^{-1} . Las extracciones se realizan mediante la utilización de fibras de PES bajo las condiciones optimizadas previamente a lo largo de la Sección IV.2.3.2.

Los resultados obtenidos para la reproducibilidad del método están recogidos en la Tabla IV.16, en donde se presentan valores aceptables de RSD (%) comprendidos entre un 4 y un 15 % para el nivel de concentración de 100 ng L^{-1} , mientras que se obtienen resultados ligeramente inferiores para algunos analitos tras la inyección sucesiva del extracto de mayor concentración (1.000 ng L^{-1}) con niveles entre un 2,7 y un 8,8 %. Estos resultados se consideran aceptables y satisfactorios puesto que incluyen toda la variabilidad del procedimiento analítico y son similares a los valores obtenidos tras emplear técnicas de extracción más convencionales como LLE [513] o SPE [288,530,763], teniendo también en cuenta que las porciones del material extractantes son cortadas manualmente en el laboratorio.

Exactitud

La exactitud del método se evaluó por medio del estudio de la recuperación relativa empleando PES como material extractante extrayendo muestras ($n=5$) de agua de mar y de influente con adición de los analitos en muestra de 100 y 500 ng L^{-1} , respectivamente. Los ISs se adicionaron también sobre la muestra a una concentración de 200 ng L^{-1} . Los resultados en forma de recuperaciones relativas (%), recogidos en la Tabla IV.16, se obtuvieron mediante el método de calibración interna tras la sustracción de las áreas obtenidas a partir de la extracción de una muestra sin adición de los compuestos de interés. Se obtuvieron excelentes resultados de recuperaciones relativas comprendidos en un rango desde un 85 y 108 %.

Se incorpora a continuación en la Figura IV.38 un cromatograma de una muestra de agua de mar con adición de los compuestos a un nivel de 100 ng L^{-1} extraído con PES.

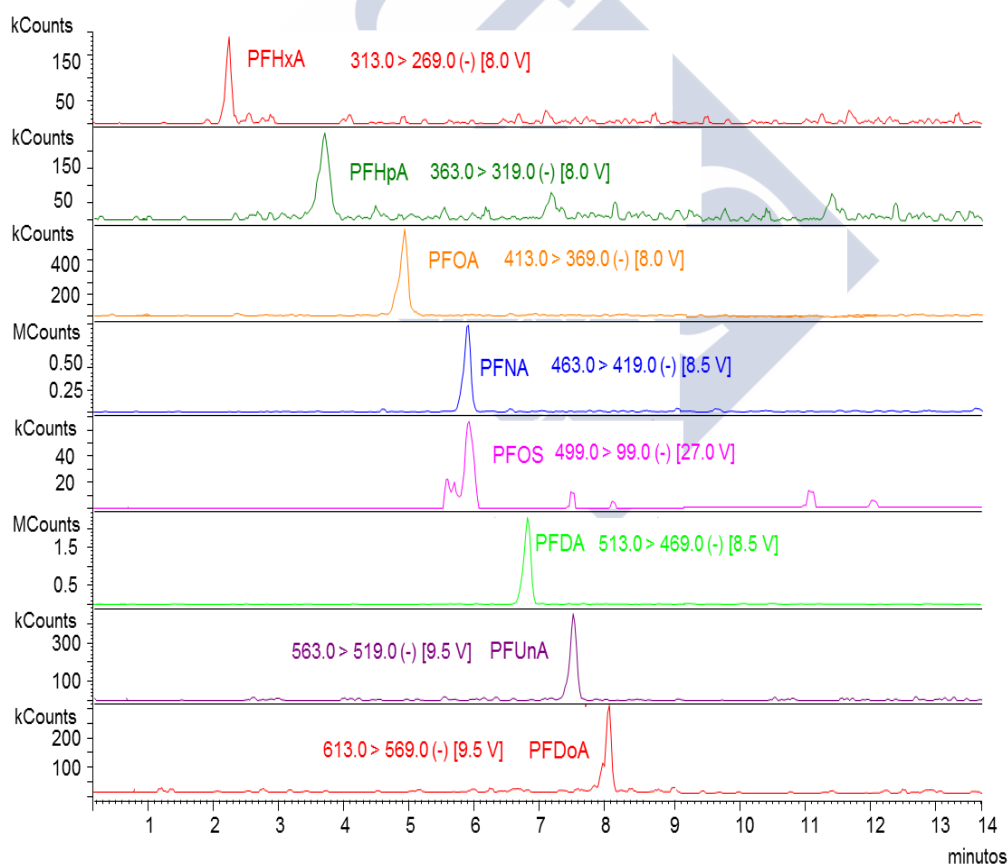


Figura IV.38. Cromatograma de una muestra de agua de mar con adición de 100 ng L^{-1} de PFASs mediante la inyección en el LC-MS/MS.

2.3.4 Aplicación a muestras reales

Como último punto del estudio, se aplicó el procedimiento a la determinación de los ocho compuestos de interés en muestras de aguas de mar, río, ría e influente integrado durante 24 horas. Los detalles en cuanto al período de recolección, tipo y la localización de las muestras empleadas en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.1.

Para efectuar el estudio se llevaron a cabo extracciones por triplicado de cada una de las muestras bajo las condiciones optimizadas a lo largo de este estudio (Sección IV.2.3.2 o esquema resumen Figura III.4) empleando PES como material extractante y adicionando 200 ng L⁻¹ de los ISs sobre la muestra. En la Tabla IV.17 se presentan los resultados obtenidos para las muestras de mar, río y ría, entre los cuales destaca el PFHxA como el analito presente en mayor concentración, con niveles de hasta 137 ng L⁻¹. En la muestra de agua de mar se detectaron tres analitos de cadena fluorocarbonada larga (C9, C10 y C11), siendo el PFNA el que alcanza mayores concentraciones (42 ng L⁻¹). Por otro lado, en la muestra de agua de ría se detectan también tres compuestos, principalmente los de menor tamaño de cadena. Por el contrario, el río es la muestra en la que se detecta un menor número de analitos, únicamente el PFOS, con uno de los niveles más bajos de entre los PFASs para estas muestras de agua superficial. Esta diferencia de concentraciones puede ser debida a que no se trata de puntos de muestreo consecutivos, sino lugares de muestreo provenientes de diferentes zonas de Galicia.

Tabla IV.17. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L⁻¹) de PFASs en muestras de mar, río y ría (n=3).

ng L ⁻¹	MAR	RÍO	RÍA
PFHxA	nd	nd	137 ± 25
PFHpA	nd	nd	71 ± 20
PFOA	nd	nd	nd
PFNA	42 ± 11	nd	15 ± 6
PFDA	31 ± 11	nd	nd
PFUnA	11 ± 8	nd	nd
PFDoA	nd	nd	nd
PFOS	nd	13 ± 3	nd

nd: no detectable (<LOD)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla IV.18 se muestran las concentraciones obtenidas para muestras de influente recogidas durante siete días consecutivos, con el objetivo de poder apreciar las variaciones de los niveles con el paso de los días. En contra de lo esperado, el PFOS sólo se detectó en el último día de estudio sin presentar niveles de concentración destacables. No ocurre lo mismo para PFHpA, PFOA, PFNA y PFDA, que fueron detectados a lo largo de toda la semana, alcanzando los valores más destacados a medida que aumenta la polaridad de los analitos. Para PFUnA y PFDoA no se obtuvieron niveles por encima de 16 ng L^{-1} , siendo detectables sólo en algunos de los días.

Tabla IV.18. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de PFASs en muestras de influente integrado (n=3).

ng L^{-1}	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7
PFHxA	nd	nd	213 ± 53	nd	nd	nd	161 ± 39
PFHpA	394 ± 66	226 ± 60	314 ± 83	345 ± 57	366 ± 55	401 ± 140	245 ± 79
PFOA	185 ± 56	232 ± 40	208 ± 24	165 ± 19	142 ± 34	179 ± 70	93 ± 23
PFNA	138 ± 22	127 ± 43	108 ± 18	122 ± 23	122 ± 40	133 ± 17	100 ± 12
PFDA	49 ± 12	41 ± 7	40 ± 11	41 ± 14	40 ± 11	50 ± 2	36 ± 4
PFUnA	16 ± 5	15 ± 6	nd	nd	nd	15 ± 5	nd
PFDoA	15 ± 1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PFOS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40 ± 10

nd: no detectable (<LOD)

2.4 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS EN AGUAS MEDIANTE SPE

2.4.1 Introducción y objetivos

Esta nueva investigación se desarrolla como método alternativo para la extracción con adsorbentes poliméricos de bajo coste que se desarrolló en la Sección IV.2.3 (estudio realizado a lo largo del año 2011). Tras la publicación de la nueva política de aguas recogida en la Directiva Europea publicada en el 2013 [266], donde se presentan concentraciones medias anuales máximas para PFOS en aguas continentales (incluyen ríos, lagos, mares y océanos $0,65 \text{ ng L}^{-1}$) y otras aguas ($0,13 \text{ ng L}^{-1}$) inferiores a aquellos niveles detectables mediante el método de extracción con materiales poliméricos ($\text{LOD: } 3 \text{ ng L}^{-1}$), surge la necesidad de desarrollar un nuevo procedimiento de extracción capaz de obtener LODs del PFOS por debajo de estos niveles. Al mismo tiempo, aunque no se encuentren recogidos en la nueva normativa, también se realizará la optimización de la nueva metodología para los PFCAs.

Por tanto, esta nueva investigación se centrará en el desarrollo de un método analítico para la determinación de ocho PFASs en muestras de aguas superficiales, principalmente orientada a muestras de agua salada. Se emplea como método de preparación de muestra SPE, técnica destacada por su baja manipulación de la muestra, altos porcentajes de recuperación, facilidad de automatización, ofrecer la posibilidad de purificar los extractos, compatibilidad con el análisis cromatográfico y lograr altos factores de preconcentración. Esto último es lo que mayor relevancia tiene para este trabajo, ya que permite utilizar grandes volúmenes de muestra iniciales concentrándolos a un pequeño volumen final, logrando de este modo elevados factores de concentración y una consecuente disminución de los LODs y LOQs.

La determinación se realiza mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) tras obtener en la anterior investigación excelentes resultados de sensibilidad y selectividad para todos los analitos.

Por tanto, este trabajo tendrá como principales objetivos:

- ✓ Optimización de los parámetros de la extracción SPE: selección de cartuchos, pH de muestra, volumen de rotura y protocolo de lavado.
- ✓ Validación del método: determinación de efectos de matriz, precisión, exactitud, LODs y LOQs.
- ✓ Aplicación a muestras reales: aguas de ríos y mar.

2.4.2 Optimización de la técnica de extracción

Pruebas preliminares

Antes de comenzar con esta investigación se realizó una revisión bibliográfica, encontrando que los tanto los cartuchos Oasis® WAX como los Oasis® HLB han sido los empleados con mayor frecuencia para la extracción de PFASs de muestras de agua de mar [274,288,524]. De hecho, en este contexto, la normativa ISO 25101:2009 [765] recomienda el uso de los Oasis® WAX. Los cartuchos Oasis® HLB están rellenos de un adsorbente de fase reversa modificado por la introducción de grupos hidrofílicos mientras que los Oasis® WAX incluyen además un intercambiador aniónico débil que permite una mejor retención de los compuestos aniónicos y el fraccionamiento de los analitos ácidos/aniónicos a partir de especies básicas y neutras durante la elución del cartucho.

Los procedimientos de optimización de los métodos de SPE descritos en la bibliografía fueron desarrollados principalmente para aguas dulces [524] aplicándose finalmente tanto a muestras de agua dulce como de agua de mar. Sin embargo, la composición del agua de mar, principalmente caracterizada por la elevada concentración de sales inorgánicas altamente superiores a las de los PFASs, puede competir con los analitos por los sitios de intercambio iónico presentes en los adsorbentes. Por otro lado, algunas de las especies interferentes retenidas al mismo tiempo en el adsorbente podrían resistir los protocolos de lavado y presentarse en el extracto final, pudiendo interferir en la etapa de análisis. Por tanto, en base a los posibles comportamientos que pueden presentar estas interferencias es necesario realizar algunas pruebas previas a través de un estudio comparativo entre las dos matrices acuosas (agua fresca y salada).

Se comenzó realizando un estudio comparativo entre las recuperaciones obtenidas empleando Oasis® WAX 150 mg (6 cc) y Oasis® HLB 200 mg (6 cc) como cartuchos de extracción. Para la realización de estas primeras pruebas se siguen los protocolos que se recogen en la bibliografía [524] para cada uno de ellos. Sin embargo, en este caso se utilizará agua de mar sintética, preparada previamente en el laboratorio de acuerdo con el método de preparación descrito por Kester et al. [734], para estudiar su comportamiento tras la extracción con ambos cartuchos. Las extracciones se realizaron por triplicado haciendo pasar a través del cartucho 500 mL de muestra con adición de los analitos a un nivel de 800 ng L⁻¹. Por un lado, los cartuchos Oasis HLB se acondicionan con 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua Milli-Q, mientras que para los cartuchos Oasis WAX se hacen pasar inicialmente 5 mL de metanol (0,4 % NH₃), y después 5 mL de metanol y 5 mL de agua Milli-Q. A continuación, se hace pasar la muestra con los analitos a través de los cartuchos, seguida de una etapa de lavado con 5 mL de agua Milli-Q y una etapa de secado

bajo corriente de nitrógeno durante 30 minutos. Finalmente, para realizar la elución de los analitos se emplean 10 mL de metanol para eluir los analitos retenidos en los cartuchos de Oasis HLB, mientras que para los cartuchos de Oasis WAX se efectúa una elución previa con 10 mL de metanol que se descarta, puesto que actuará como disolvente de lavado para la elución de las especies neutras retenidas en el cartucho, mientras que la segunda elución realizada con 10 mL de metanol (0,4 % NH_3) actuará sobre el intercambiador liberando las especies cargadas (analitos). Se inyectaron directamente alícuotas procedentes de los eluatos de ambos cartuchos en el sistema LC-MS/MS.

En la Figura IV.39 se pueden ver las recuperaciones obtenidas para cada uno de los cartuchos empleados en la extracción, dónde se aprecia claramente una amplia diferencia entre ambos, resultando ser los cartuchos Oasis HLB los que proporcionan mejores recuperaciones desde 38 hasta 117 %, mientras que con Oasis WAX no se obtienen recuperaciones superiores a un 28 %. Por otro lado, destaca claramente la relación que existe entre la longitud de la cadena fluorocarbonada y los valores de recuperación, dónde se puede ver que al incrementar la polaridad de los analitos se logran mejores recuperaciones. Sin embargo, el PFOS presenta un comportamiento muy similar al que se obtiene para el analito de menor polaridad, generando recuperaciones similares entorno al 45 %.

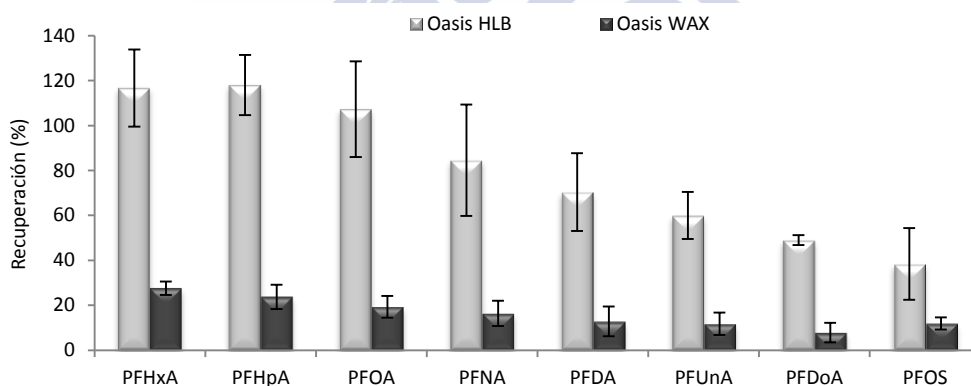


Figura IV.39. Recuperaciones (%) de los PFASs extraídos mediante los protocolos optimizados en la bibliografía para Oasis HLB y WAX.

Las recuperaciones obtenidas en este estudio no se asemejan en nada a las recogidas en la bibliografía cuando se aplicaban estos protocolos a muestras de agua Milli-Q, donde las recuperaciones generadas eran superiores al 80 % con ambos cartuchos, a excepción del PFHxA con cartuchos de HLB que eran del 30 % [524]. Esto llama la atención principalmente con los cartuchos WAX puesto que, para este estudio, no superan el 28 % de

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

recuperación para ninguno de los analitos. Esta diferencia puede ser debida a la competición que puede existir entre las diferentes especies iónicas presentes en la muestra de agua de mar (sintética) por los sitios de intercambio aniónico presentes en el cartucho. Por tanto, se procede a realizar una prueba adicional donde se estudia en detalle el mecanismo de retención de los cartuchos Oasis WAX. Para ello, se repitió el protocolo anterior de los cartuchos Oasis WAX, realizando en este caso una comparación por duplicado entre la muestra de mar sintética y una muestra de agua Milli-Q analizando los dos eluatos, el de 10 mL de metanol y los 10 mL de metanol (0,4 % NH_3).

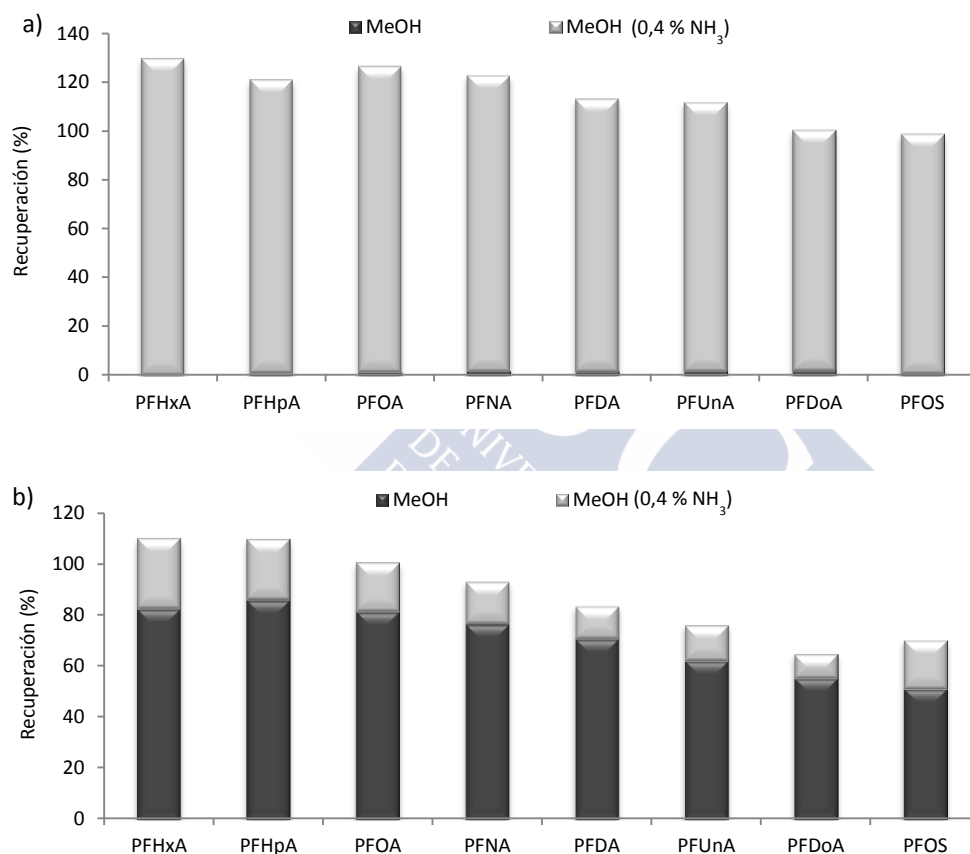


Figura IV.40. Recuperaciones (%) obtenidas con cartuchos Oasis WAX para muestras de: a) agua Milli-Q y b) agua de mar sintética.

Según lo que se muestra en la Figura IV.40.a, en la extracción realizada con muestra de agua dulce (Milli-Q) los analitos se extraen en la segunda fracción, en la que se añade NH_3 al eluyente, lo que confirma que la retención de los analitos en el cartucho tiene lugar por medio de un mecanismo de intercambio aniónico. Sin embargo, no ocurre lo

mismo para las muestras de agua salada (Figura IV.40.b), donde se puede ver cómo los analitos son eluidos del cartucho principalmente en la fracción metanólica. Estos resultados demuestran que para las muestras de agua de salada, extraídas utilizando cartuchos Oasis WAX, el intercambio iónico dentro del cartucho no juega un papel tan importante como en el caso de las aguas dulces, siendo por tanto el mecanismo de fase reversa el que desempeña un papel más importante. Viendo en este caso que los resultados de las recuperaciones obtenidas para estos PFASs tras emplear los cartuchos Oasis WAX están comprendidas entre aproximadamente un 60 y un 110 %, siendo por tanto similares a los resultados obtenidos previamente con los cartuchos Oasis HLB (38 - 117 %), debe ser un cartucho a tener en cuenta en los próximos pasos para de optimización.

En un intento de mejorar la adsorción de los analitos aniónicos en el cartucho Oasis WAX mediante un mecanismo de intercambio aniónico, se introdujo una etapa de lavado adicional con 25 mM de tampón de acetato a pH 4, con la intención de eliminar las interferencias que puedan estar provocadas por las sales y las biomoléculas (ej. lípidos o proteínas) presentes en la muestra, mejorando así la adsorción de los aniones en el cartucho [524]. Estos ensayos se realizaron por triplicado empleando agua de mar sintética (500 mL) con adición de los analitos a nivel de 800 ng L^{-1} . Al igual que en los casos anteriores, se hacen pasar 5 mL de MeOH seguidos de 5 mL de MeOH (0,4 % NH_3) y 5 mL de Milli-Q para acondicionar el cartucho. Tras la introducción de la muestra, se realiza la etapa de lavado con 4 mL de NH_4OAc en agua (25 mM) a pH 4 (ajuste realizado con ácido acético). Después de la etapa de secado, la elución se realiza con 10 mL de MeOH seguido de 10 mL de MeOH (0,4 % NH_3) inyectándose en el sistema las alícuotas de ambos eluatos. Sin embargo, pese a los resultados observados en otras investigaciones, en este caso no se apreciaron diferencias significativas tras los lavados con NH_4OAc (Figura IV.41).

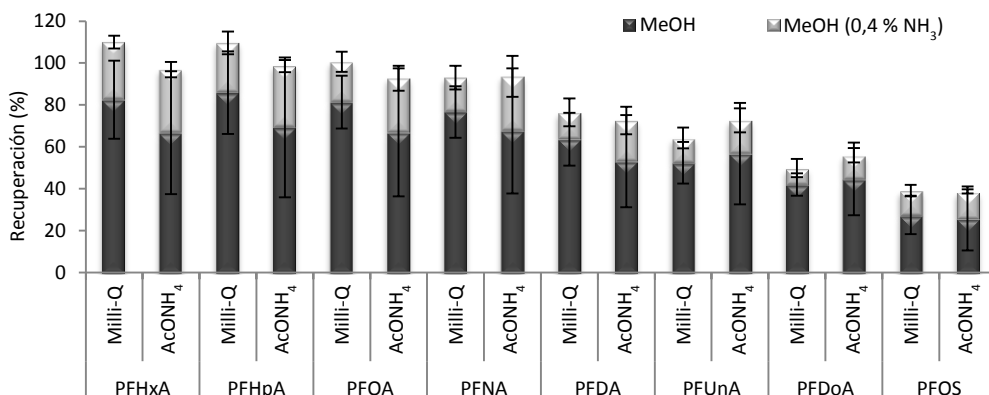


Figura IV.41. Recuperaciones (%) obtenidas para los PFASs realizando los lavados con tampón de NH_4OAc frente a lavados realizados con agua Milli-Q.

Esto no hace más que demostrar que los métodos de SPE que emplean cartuchos de modo mixto desarrollados con agua dulce no pueden ser directamente aplicados a muestras de aguas marinas. Obviamente, las fracciones de metanol puro y la fracción de metanol (0,4 % NH_3) pueden combinarse y medirse en combinación, pero es más simple emplear una única elución con el metanol basificado.

pH de la muestra

El valor del pH de la muestra es otro de los factores ampliamente estudiado en diferentes procedimientos de SPE [288,307,513], siendo por tanto, un parámetro a tener en cuenta en esta investigación. Para ello, se comparan las recuperaciones obtenidas con muestras de agua de mar sintética acidificadas (pH 2) frente a las muestras sin ajuste de pH (pH~8). Las extracciones se realizaron por triplicado con ambos cartuchos, empleando volúmenes de muestra de 500 mL con adición de los analitos a niveles de 800 ng L^{-1} . El protocolo seguido para el acondicionamiento de los cartuchos fue el mismo que el realizado en el punto anterior: 5 mL de metanol seguido de 5 mL de agua Milli-Q para Oasis® HLB; y 5 mL metanol (0,4 % NH_3), 5 mL de metanol y 5 mL agua Milli-Q para Oasis® WAX. Las eluciones se realizaron, al igual que en el caso anterior, con 10 mL metanol (Oasis® HLB) o 10 mL metanol (0,4 % NH_3) (Oasis® WAX). Finalmente, se toma una alícuota de cada eluato y se procede al análisis en el equipo LC-MS/MS.

Los resultados de la recuperación en ambos cartuchos se muestran recogidos en la Figura IV.42. Como se puede observar, el proceso de acidificación de la muestra no logra mejorar los resultados para ninguno de los dos tipos de cartuchos, de hecho incluso se obtienen recuperaciones inferiores a las generadas por la muestra sin acidificar siendo más notable la diferencia a mayor longitud de la cadena. Esto podría atribuirse a una protonación parcial de los analitos que conllevaría la adsorción de los analitos en el material de vidrio. Por tanto, en base a los resultados obtenidos se decide continuar la optimización del procedimiento sin modificar el pH de la muestra.

También se consideró la formación de par iónico con TBA como una posible alternativa [307], sin embargo, la idea fue descartada tras realizar unas pruebas previas en agua de mar y comprobar que su adición a muestras saladas originaba la obstrucción de los cartuchos impidiendo de este modo el paso de la muestra.

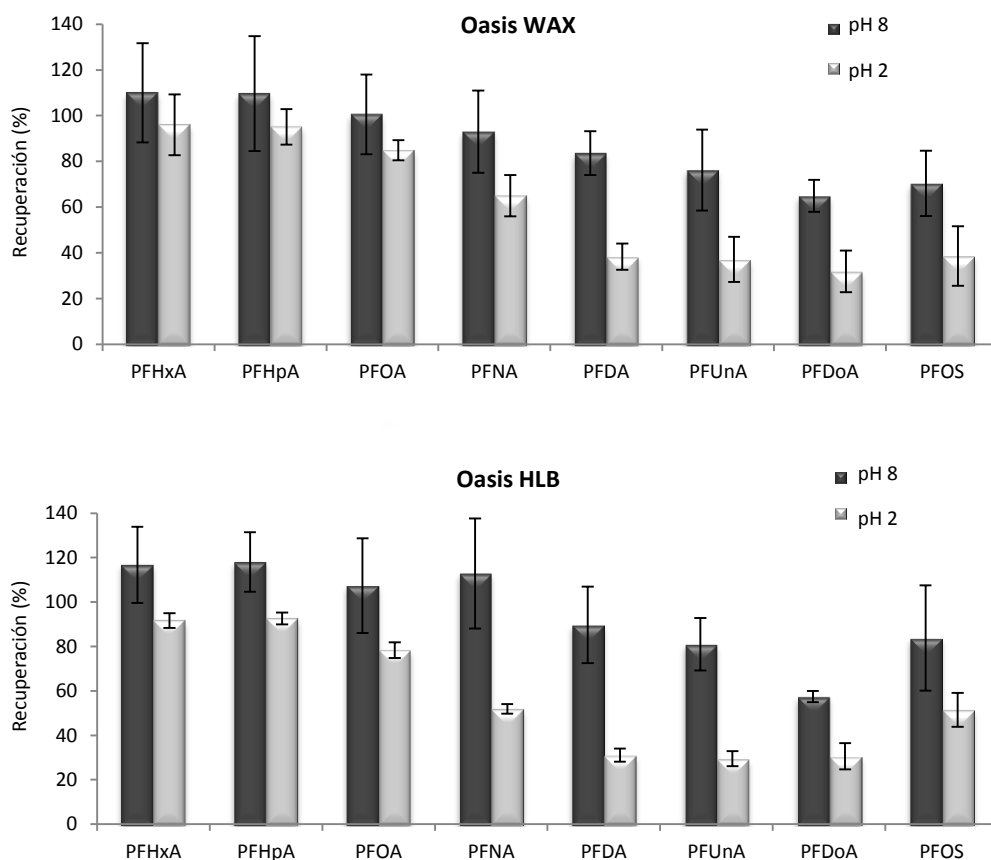


Figura IV.42. Recuperaciones (%) obtenidas para los PFASs al modificar el pH de la muestra de agua de mar sintética.

Volumen de rotura

Uno de los parámetros que se deben evaluar, y más en este caso que precisamos volúmenes de muestra más elevados para lograr disminuir los LODs, es el volumen de rotura. Este parámetro fue evaluado por duplicado tanto para los cartuchos de Oasis® HLB (200 mg) como para los de Oasis WAX® (150 mg). Para ello, se disponen dos cartuchos en serie y se hacen pasar 2 L de agua Milli-Q y de agua de mar sintética con adición de los analitos a nivel de 10 ng L^{-1} . La etapa de acondicionamiento de los cartuchos ha sido la misma que la aplicada previamente: para los Oasis HLB se hacen pasar a su través 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua Milli-Q, mientras que para los cartuchos Oasis WAX se hace pasar inicialmente 5 mL de metanol (0,4 % NH_3), seguidos de 5 mL de metanol y 5 mL de agua Milli-Q. Tras el acondicionamiento se dispone la colocación en serie de los

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

correspondientes cartuchos y se procede al paso de la muestra. A continuación, se desmonta el sistema de montaje en serie, se realiza la etapa de lavado con 5 mL de agua Mill-Q y el secado de los cartuchos por separado bajo corriente de nitrógeno. La elución de los analitos dependerá de nuevo del tipo de cartucho, haciendo pasar por un lado 10 mL de metanol los cartuchos de Oasis HLB y con 10 mL de metanol (0,4 % NH_3) los Oasis WAX. Los eluatos se concentran a 100 μL de metanol, procediendo a la inyección en el equipo LC-MS/MS.

Según lo que se presenta en la Figura IV.43, todos los analitos fueron detectados principalmente en el cartucho superior (> 98 %), presentando este comportamiento para ambos tipos de cartuchos. Por tanto, se concluye en que no existe rotura de los analitos cuando se emplean volúmenes de muestra de hasta 2 L, incluso en muestras de agua salada, llegando a obtener así factores de concentración de hasta 20.000 veces.

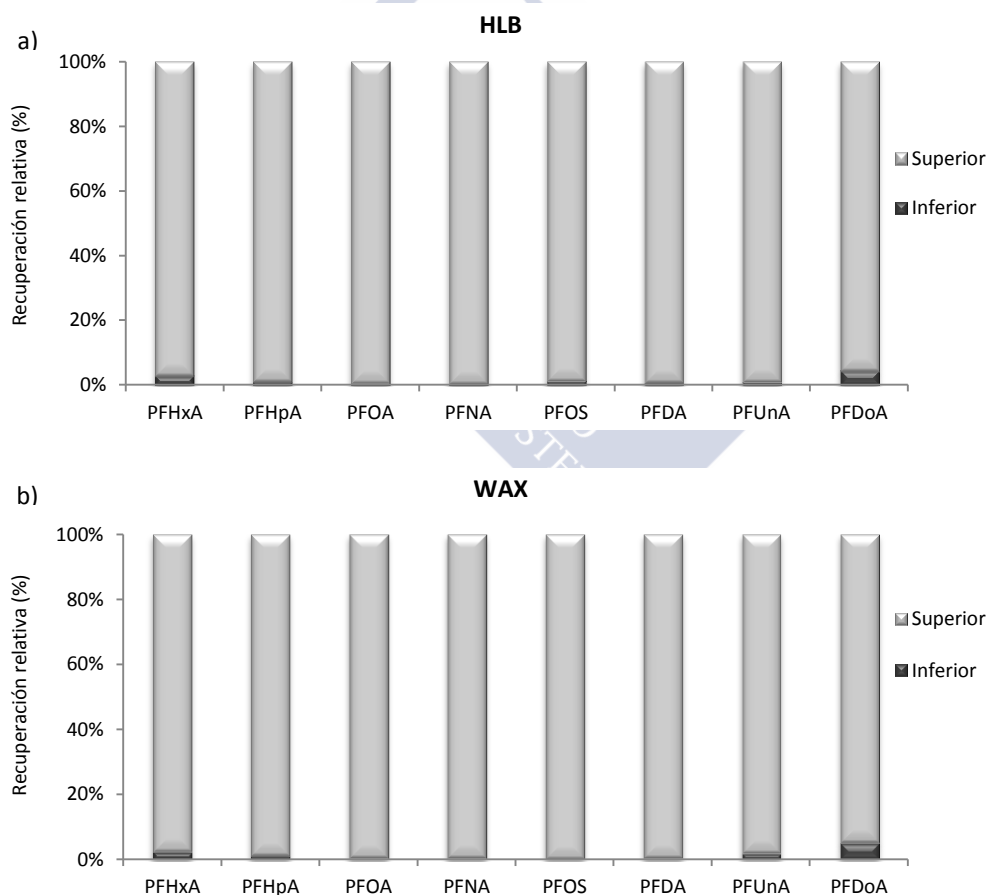


Figura IV.43. Recuperaciones relativas (%) obtenidas tras el estudio del volumen de rotura de muestras de agua de mar sintética extraída con cartuchos: a) Oasis® HLB y b) Oasis® WAX.

Etapas de lavado

Los protocolos de lavado se evaluarán como hasta ahora para los dos tipos de cartuchos estudiados. Vistas las conclusiones de las secciones previas, los PFCAs y el PFOS se eluyen de ambos tipos de cartuchos con metanol cuando se usan muestras de agua de mar sintética, por lo que no se puede utilizar metanol puro en la etapa de limpieza ya que eluiría todos los analitos retenidos en el cartucho. Por tanto, se plantea la posibilidad de adicionar diferentes porcentajes de metanol sobre agua Milli-Q empleada en el lavado para lograr la máxima eliminación de interferencias retenidas en los cartuchos sin que ello conlleve la pérdida de analitos. Se realizaron extracciones por duplicado para ambos tipos de cartuchos (Oasis® WAX y HLB) con 1 L de muestra de agua de mar sintética con adición de los analitos a 10 ng L^{-1} . Las etapas de acondicionamiento de los cartuchos fueron las mismas que en las secciones anteriores para cada uno de los cartuchos: Oasis® HLB con 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua Milli-Q, mientras que para los cartuchos Oasis® WAX se hacen pasar inicialmente 5 mL de metanol (0,4 % NH_3), seguidos de 5 mL de metanol y 5 mL de agua Milli-Q. A continuación, se introduce la muestra en los correspondientes cartuchos y se procede a la etapa de lavado empleando en un primer lavado 5 mL de agua Milli-Q seguido de un segundo lavado con agua Milli-Q con diferentes porcentajes de metanol (10, 25, 50 y 75 %). Se realiza una primera etapa de secado de los cartuchos entre las dos etapas de lavado y una segunda etapa al finalizar, ambas se realizan bajo corriente de nitrógeno durante casi 30 minutos. La elución se lleva a cabo con 10 mL de metanol o metanol (0,4 % NH_3) en el caso de Oasis® HLB o WAX, respectivamente. Para esta prueba se recoge el eluato procedente de la segunda etapa de lavado (la que contiene los diferentes porcentajes de metanol en agua) y el procedente de la etapa de elución final. Ambos, de forma independiente, se concentran a $100 \mu\text{L}$ de metanol quedando listos para su posterior inyección en el equipo de LC-MS/MS.

En la Figura IV.44 se presentan tres de los diferentes analitos estudiados para ver la influencia que podría ejercer sobre los analitos con mayor diferencia estructural. Las extracciones realizadas con cartuchos de Oasis® HLB (Figura IV.44) muestran un comportamiento diferente en función de la longitud de la cadena fluorocarbonada. Para los analitos de cadena larga (C8 - C12), junto con el PFOS, podría añadirse hasta un 25 % de metanol al agua Milli-Q para efectuar el lavado sin perder analitos; no obstante para los de cadena corta (C6 y C7) se pierde hasta un 80 % de los analitos en la etapa de lavado empleando un 25 % de metanol en agua Milli-Q. Sin embargo, lavando con un 10 % de metanol no se producen pérdidas significativas de los analitos, excepto PFHxA (18 %). En el caso de los cartuchos Oasis® WAX no se producen pérdidas en la etapa de lavado ni siquiera añadiendo un 75 % de metanol. Por tanto, se establece una etapa de lavado de un 10 % y

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de un 75 % de metanol en agua Milli-Q para los cartuchos de Oasis® HLB y Oasis® WAX, respectivamente.

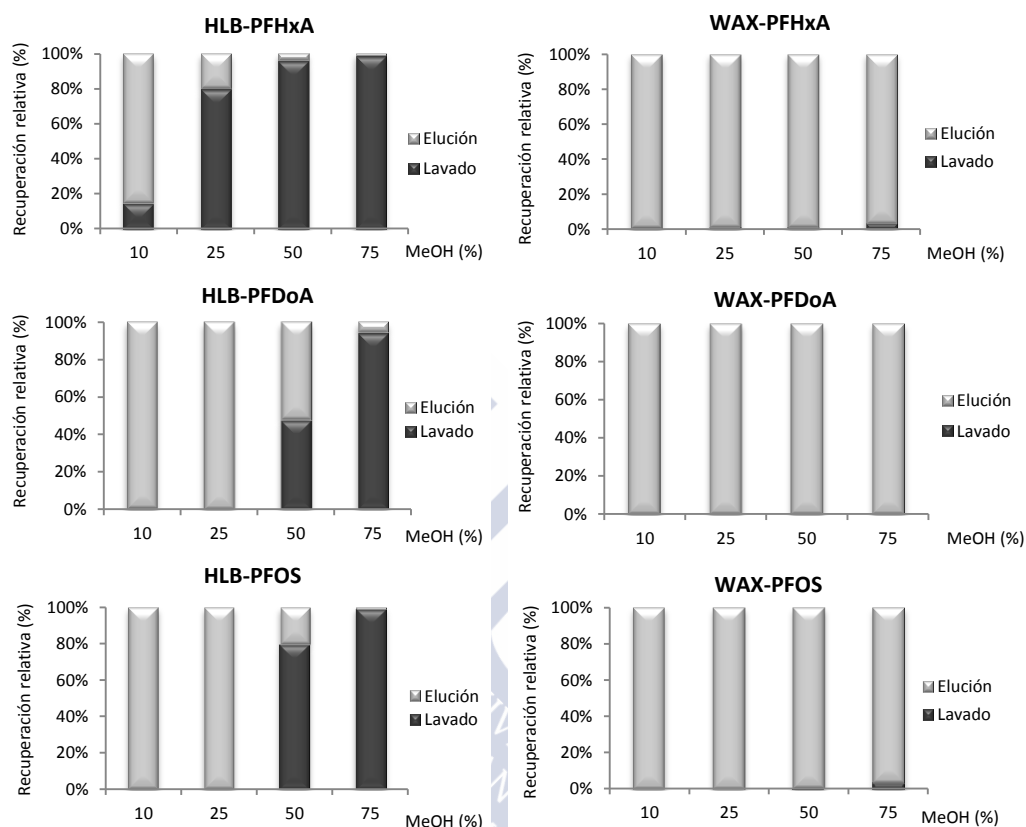


Figura IV.44. Recuperaciones relativas (%) de PFHxA, PFDoA y PFOS de la segunda etapa de lavado tras emplear diferentes porcentajes de metanol en agua Milli-Q y los eluatos, mediante la extracción con Oasis® HLB (izquierda) y Oasis® WAX (derecha).

2.4.3 Caracterización analítica del método

Antes de comenzar la validación del método de extracción SPE-LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) se procederá a la selección de uno de los dos cartuchos estudiados hasta este punto (Oasis® WAX y HLB) y cuyos parámetros fueron optimizados a lo largo de la Sección IV.2.4.2. Una vez seleccionado, se realizará la validación del método mediante estudios de precisión, exactitud y los LODs y LOQs.

Comparación de protocolos

A la hora de realizar la extracción en fase sólida, la elección del cartucho adecuado es un aspecto importante a tener en cuenta con el fin de obtener mejores recuperaciones y selectividades de los analitos de interés frente a los demás componentes de la muestra. Para ello, se efectúa un estudio comparativo entre ambos cartuchos (Oasis® HLB y Oasis® WAX) a través de cuatro protocolos diferentes, cada uno de ellos formulados con respecto a los resultados obtenidos en la sección anterior. Por tanto, se evaluará el tipo de cartucho a emplear y la necesidad o no de realizar una segunda etapa de lavado con contenido metanólico. La selección del cartucho y del procedimiento óptimo de lavado se realizará en base a los valores de recuperación y a los efectos de matriz del sistema LC-MS/MS para ambos tipos de muestras acuosas (agua dulce de río y agua salada de mar). A modo de simplificar, la Tabla IV.19 presenta las diferentes combinaciones obtenidas para cada uno de ellos.

Tabla IV.19. Diferentes protocolos estudiados para la selección del cartucho y del procedimiento de lavado.

PROTOCOLO	ACONDICIONAMIENTO	MUESTRA	LAVADO Y SECADO	ELUCIÓN
A. Oasis HLB	5 mL MeOH 5 mL Milli-Q	1 L río / mar	5 mL Milli-Q 30 min N ₂	10 mL MeOH
B. Oasis HLB	5 mL MeOH 5 mL Milli-Q	1 L río / mar	5 mL Milli-Q 5 mL Milli-Q (10 % MeOH) 30 min N ₂	10 mL MeOH
C. Oasis WAX	5 mL MeOH (0,4 % NH ₃) 5 mL MeOH 5 mL Milli-Q	1 L río / mar	5 mL Milli-Q 30 min N ₂	10 mL MeOH (0,4 % NH ₃)
D. Oasis WAX	5 mL MeOH (0,4 % NH ₃) 5 mL MeOH 5 mL Milli-Q	1 L río / mar	5 mL Milli-Q 5 mL Milli-Q (75 % MeOH) 30 min N ₂	10 mL MeOH (0,4 % NH ₃)

A. Exactitud

Se evaluó únicamente la recuperación del proceso de preparación de la muestra, efectuando el cálculo mediante la comparación de un extracto de la muestra ($n=3$) con adición de 200 ng L⁻¹ de los analitos previa a la SPE, frente a un extracto con adición del mismo nivel de los analitos tras el proceso de extracción ($n=4$), excluyendo así los efectos

de matriz en el sistema LC-MS/MS. Las recuperaciones obtenidas con ambos tipos de cartuchos para los cuatro protocolos son similares, estando con el Oasis HLB comprendidas entre 73 hasta 114 % y con el Oasis WAX entre 72 hasta 113 % en muestras de río. En el caso de las muestras de mar, las recuperaciones quedaron comprendidas desde 70 a 103 % y desde 72 a 98 % para cartuchos Oasis HLB y WAX, respectivamente.

Viendo que las recuperaciones son bastante similares entre ambos cartuchos, la selección del cartucho de extracción óptimo estará basada en los efectos de matriz que presenta cada uno de ellos.

B. Efectos de matriz

Los efectos de matriz en el sistema LC-MS/MS fueron evaluados mediante la comparación entre un extracto de una muestra real con adición posterior a la etapa de extracción de los analitos a un nivel de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=4$) y un estándar en metanol de la misma concentración.

En la Figura IV.45 se representan, para agua de mar (Fig. IV.45.a) y río (Fig. IV.45.b), los porcentajes de efecto matriz calculados de acuerdo con la Ecuación 4 para cada uno de los protocolos de trabajo junto con sus SDs, donde valores superiores al 100 % implican un incremento de la señal y valores inferiores la supresión de la misma [754]. Se puede apreciar cómo, para ambos tipos de matrices, los analitos más polares (PFHxA y PFHpA) se ven más fuertemente afectados con una supresión de la señal (próxima al 50 %). No obstante, aunque ambos tipos de cartuchos proporcionen similares efectos de matriz para muestras de río, no ocurre lo mismo en muestras de mar, donde los menores efectos de matriz los proporcionan los cartuchos de Oasis HLB empleando como método de lavado un 10 % de metanol (protocolo B), tanto para muestra de río como de mar. Estos efectos de matriz se corrigen mediante el uso de ISs, pero no logran compensar la pérdida de sensibilidad causada por la supresión de la señal, afectando en consecuencia a los LODs y LOQs, lo que es un punto negativo en el análisis de PFASs debido a que se necesitan detectar concentraciones inferiores a los ng L^{-1} , especialmente en muestras marinas.

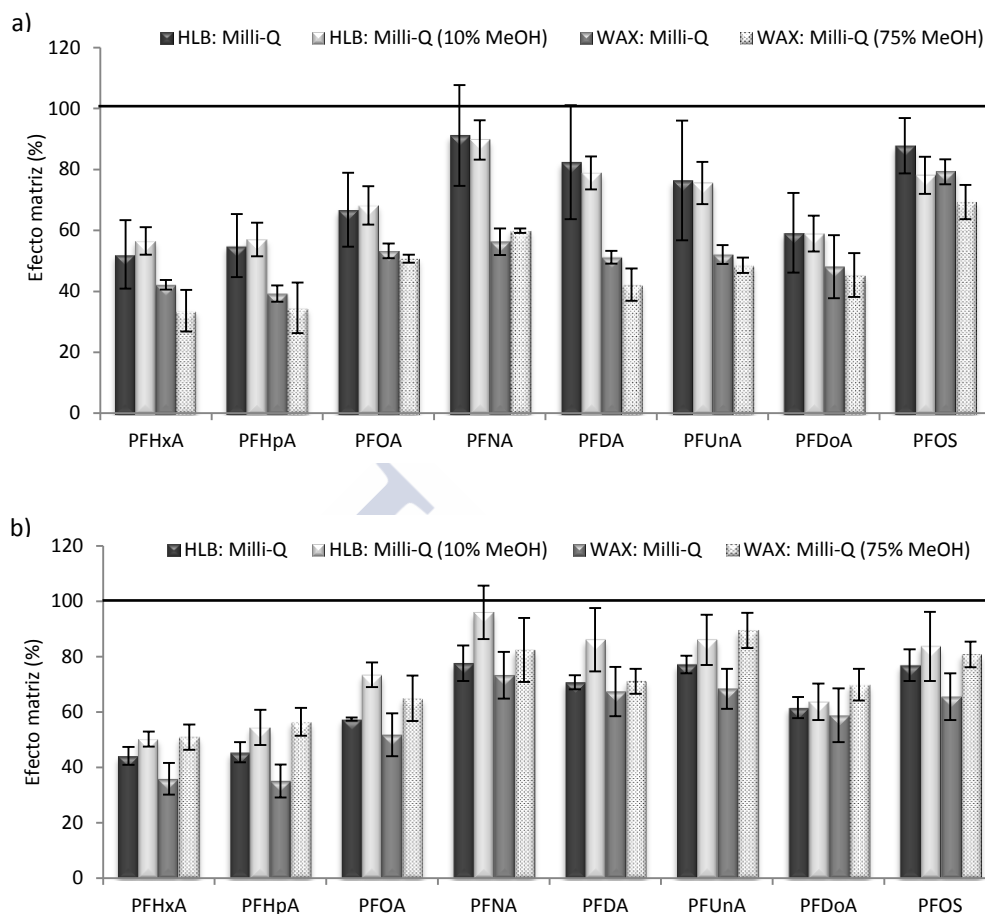


Figura IV.45. Efectos de matriz (%) obtenidos para los diferentes protocolos de SPE para muestras de: a) mar y b) río.

Finalmente, en base a los resultados anteriores, tanto de recuperaciones del método de preparación de muestra como de los resultados de los efectos de matriz del sistema, se seleccionan los cartuchos de Oasis HLB realizando la etapa de limpieza con un 10 % de metanol en agua Milli-Q, logrando así una extracción óptima de los PFASs y una mejor sensibilidad de los mismos.

Exactitud y precisión

Una vez seleccionado el tipo de cartucho a emplear y teniendo ya optimizado el procedimiento de extracción, se procede a la validación del método SPE-LC-(ESI)-MS/MS(QqQ). La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación,

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mientras que la precisión se evalúa en función de la desviación estándar relativa (RSD, %), empleando los correspondientes ISs. Para ello, se realizan extracciones ($n=4$) de 1 L agua Milli-Q, río y mar, bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.4.2 presentadas de forma resumida en la Sección III.3.4, y con adición de los analitos y los correspondientes ISs a un nivel de 2 ng L^{-1} de concentración en muestra. En la Tabla IV.20 se expresan los resultados de la exactitud expresados en porcentaje de recuperación y las correspondientes RSD.

Tabla IV.20. Recuperaciones, LODs y LOQs del proceso SPE-LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) para PFASs tras la corrección con los correspondientes IS (2 ng L^{-1}).

COMPUESTO	RECUPERACIÓN RELATIVA (%) (RSD)			LODs (ng L^{-1})	LOQs (ng L^{-1})
	MILLI-Q	RÍO	MAR		
PFHxA	96,9 (6,0)	109,1 (9,4)	110,1 (8,9)	0,21	0,72
PFHpA	87,0 (5,4)	70,5 (7,3)	91,9 (0,7)	0,08	0,26
PFOA	96,2 (4,5)	88,9 (3,8)	92,3 (4,0)	0,03	0,11
PFNA	92,7 (2,5)	104,8 (5,9)	111,8 (9,6)	0,01	0,03
PFDA	104,2 (7,5)	117,0 (10,2)	112,1 (11,3)	0,02	0,07
PFUnA	104,0 (12,8)	108,7 (9,5)	101,3 (6,8)	0,02	0,06
PFDoA	106,1 (20,1)	111,2 (4,5)	95,3 (6,2)	0,04	0,12
PFOS	97,0 (19,3)	99,5 (7,2)	95,9 (15,3)	0,04	0,12

Como se puede ver, se obtienen recuperaciones satisfactorias, calculadas por medio de la calibración del IS, corrigiendo así los errores producidos en la etapa de preparación de la muestra o los posibles efectos matriz, obteniéndose recuperaciones comprendidas entre 87 y 106 % para muestras de agua Milli-Q, entre 71 y 117 % con muestras de río y entre 92 y 112 % para las muestras de mar. En cuanto a la precisión del método, se obtienen valores de aceptables y similares a los encontrados en la bibliografía para muestras de mar y aguas superficiales [284,288,295,307,312] con niveles de RSD inferiores al 20 % teniendo en cuenta las bajas concentraciones utilizadas en este estudio.

A continuación, en la Figura IV.46, se muestra un cromatograma de una muestra real de mar con adición de los analitos a un nivel de 2 ng L^{-1} de concentración.

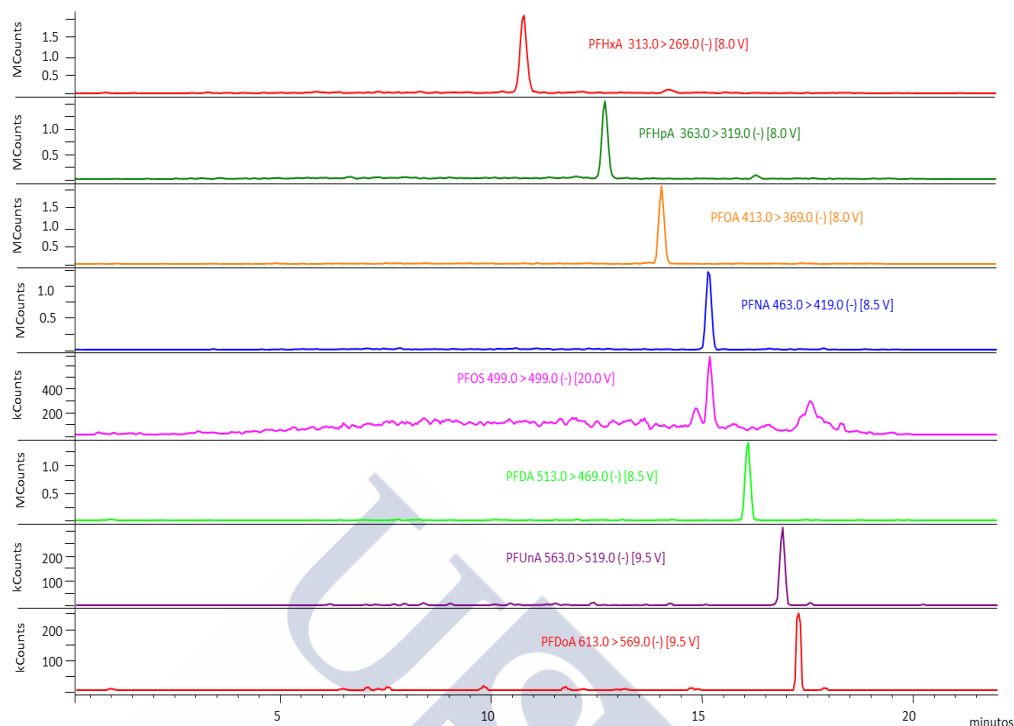


Figura IV.46. Cromatograma de una muestra de mar con adición de PFASs (2 ng L^{-1}).

LODs, LOQs y estudio de blancos

Uno de los principales problemas que se recogen en la bibliografía asociados con el análisis a niveles traza de los PFASs es la contaminación de fondo presente en los blancos de análisis. Se identificaron en la bibliografía diferentes fuentes instrumentales y de proceso como los cartuchos SPE, el agua como reactivo purificante, filtros, tubos de plástico y el equipo LC-MS [296,524]. En este estudio se descartó la presencia de contaminación instrumental tras la comprobación realizada en la Sección IV.1.2.4. Sin embargo, todos los compuestos estudiados se detectaron en los blancos del procedimiento evaluados con agua Milli-Q a niveles de concentración de entre $0,008 \text{ ng L}^{-1}$ del PFNA y $0,10 \text{ ng L}^{-1}$ del PFHxA. Por tanto, los LODs y LOQs se calcularon como 3 o 10 veces la SD del blanco ($LOD = 3 \cdot SD$ o $LOQ = 10 \cdot SD$) de agua Milli-Q (método *b* en Sección IV.1). Se obtuvieron niveles de LODs y LOQs satisfactorios (Tabla IV.20) con valores inferiores a $0,08$ y $0,26 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente, excepto para el PFHxA ($0,21$ y $0,72 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente). Los LODs obtenidos para los PFASs son comparables e incluso mejores que los obtenidos para las extracciones realizadas también mediante SPE y LC-MS/MS encontrados en la bibliografía [288,307,513,524,766,767]. Únicamente Yamashita et al.

lograron niveles de LOQs inferiores (rango pg L^{-1}), aunque no queda muy claro qué procedimiento aplica para realizar su cálculo, variando los valores en función de la publicación [289,296].

Pese a todo, se lograron disminuir los LODs y LOQs de todos los analitos estudiados respecto a los obtenidos en la investigación realizada con el material polimérico (Sección IV.2.3). Destacar también los niveles de LOQs obtenidos para el PFOS, puesto que se lograron niveles inferiores a los estándares de calidad medioambiental tanto para aguas superficiales o continentales establecidos en la nueva Directiva [266].

2.4.4 Aplicación a muestras reales

Como última parte del estudio, el método optimizado y validado se aplica a la determinación de ocho PFASs en aguas de mar y río. Los detalles en cuanto al período de recolección, tipo y localización de las muestras empleadas en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.1.

La determinación de los PFASs en las muestras citadas se realiza por triplicado bajo las condiciones optimizadas de extracción, recogidas a modo resumen en la Sección III.3.4, adicionando los ISs a una concentración de 2 ng L^{-1} . En la Tabla IV.21 se recogen las diferentes concentraciones obtenidas de las muestras de agua analizadas.

Como era de esperar, las concentraciones encontradas en las muestras de río son considerablemente superiores a las que se detectan en las muestras de mar, donde se detectan todos los analitos, a excepción del PFUnA en las muestras de río. Además, entre los diferentes analitos, el PFHxA fue el PFCA detectado a mayor concentración en ambos tipos de muestras. En rasgos generales, las concentraciones detectadas en las muestras de ríos son superiores a las que se detectaron en estudios previos realizados en Alemania, China y EEUU [287,308,527]. En cuanto a las muestras de agua de mar, los niveles detectados de los PFCAs más polares (PFHxA y PFHpA) son superiores a los registrados en la bibliografía referidos a zonas costeras [292], mientras que las concentraciones de PFOA y PFOS son similares a las detectadas en las áreas costeras de Hong Kong, el sur de China, Corea [289] y la región noroeste del océano Pacífico [292], pero superiores a las encontradas en zonas oceánicas abiertas, como la zona occidental del océano Pacífico o la zona norte del océano Atlántico [213].

Tabla IV.21. Concentraciones ($\bar{x} \pm SD$, ng L⁻¹) de PFASs en muestras de aguas de río y mar.

ng L ⁻¹	RÍO 1	RÍO 2	MAR 1	MAR 2	MAR 3
PFHxA	63 ± 8	57 ± 10	21 ± 2	33 ± 2	31,1 ± 0,2
PFHpA	13 ± 1	12 ± 1	6 ± 1	12,8 ± 0,9	12 ± 2
PFOA	43 ± 3	43 ± 4	2,2 ± 0,3	3,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2
PFNA	7 ± 1	8 ± 1	2,6 ± 0,4	1,6 ± 0,3	2,1 ± 0,2
PFDA	6 ± 1	5 ± 2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2
PFUnA	nd	nd	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2
PFDoA	3,0 ± 0,8	2,3 ± 0,6	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1
PFOS	16 ± 4	64 ± 7	0,4 ± 0,2	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03

nd: no detectable (<LOD)

Por otro lado, tanto el PFOA como el PFHpA se producen a través de la degradación atmosférica de los precursores volátiles, mientras que el PFOA también se libera directamente al medioambiente. Así, la relación de concentraciones entre PFHpA y PFOA se propuso como un indicador de las fuentes de PFASs [535]. Por tanto, la elevada relación entre ambos compuestos en muestras de mar (2,7 - 4,6) indica que predomina la contaminación a través de fuentes atmosféricas. Sin embargo, en contraste con lo anterior, las bajas relaciones presentes en las muestras de río (0,28 - 0,30) cumplirían la hipótesis de que las aguas procedentes de las estaciones depuradoras son las principales fuentes de contaminación de las aguas dulces medidas.

Aunque los niveles del PFOS encontrados en este estudio no superan las concentraciones máximas establecidas por la Unión Europea [266], sí que se encuentran por encima de la concentración media anual establecida en muestras de río (aguas superficiales), por tanto sería necesario una monitorización de larga duración para estudiarlo de forma más detallada y precisa.



2.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS PERFLUOROALQUILADOS EN MOLUSCOS MEDIANTE MSPD

2.5.1 Introducción y objetivos

El principal objetivo de esta investigación es el desarrollo de un método que permita determinar de forma simultánea ocho PFASs (PFOS y siete PFCAs (C6 - C12)) en diversas muestras de moluscos. Los mejillones están considerados como un bioindicador de la contaminación marina por su elevado poder de acumulación, sin embargo, al igual que otros moluscos, presenta una gran cantidad de contenido lipídico que dificulta la extracción de los analitos contenidos en su interior. Para ello, se vuelve a seleccionar como método de preparación de muestra la MSPD, de nuevo en base a las ventajas ofrecidas frente a las técnicas más clásicas y al excelente comportamiento demostrado frente a este tipo de matrices, ya que ofrece la posibilidad de realizar de forma simultánea la limpieza y extracción de los analitos.

Para la determinación de estos analitos en las matrices de interés se emplea de nuevo la LC-(ESI)-MS/MS(QqQ), ya que tal y como se comentó anteriormente se trata de una técnica que ofrece una elevada sensibilidad y selectividad, permitiendo la identificación inequívoca de todos los contaminantes analizados.

Esta investigación tiene como principales objetivos:

- ✓ Optimización de las condiciones de extracción mediante MSPD: selección del disolvente de elución, elección del adsorbente y dispersante, y optimización mediante un diseño experimental de las cantidades necesarias de disolvente, adsorbente y dispersante.
- ✓ Validación del método: determinación de efectos de matriz, exactitud, precisión, LODs y LOQs.
- ✓ Aplicación a muestras reales: mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), berberechos (*Cerastoderma edule*) y almeja japónica (*Ruditapes philippinarum*).

2.5.2 Optimización de la técnica de extracción

Selección del disolvente de elución y adsorbente de limpieza

El primer paso a la hora de optimizar la extracción de los compuestos mediante la técnica de MSPD, consiste en la selección del disolvente y adsorbente de limpieza más adecuado. Para ello, se escogieron dos disolventes, el diclorometano y el acetonitrilo, ya que, de acuerdo a lo recogido en la bibliografía, presentan poca afinidad por las partículas lipídicas y son ampliamente empleados en MSPD [681]. No obstante, no fueron los únicos evaluados. Se estudió previamente la posibilidad de utilizar metanol, sin embargo presentaba numerosos problemas a la hora de efectuar la etapa de limpieza del extracto al provocar la extracción de una gran cantidad de materia grasa. Como adsorbentes se evaluaron la alúmina, Florisil, sílice y sílice con H_2SO_4 en relación 60:40 (w/w). Según se recoge en la bibliografía el diclorometano puede ser empleado en combinación con una limpieza con ácido sulfúrico [684]. Sin embargo, en base a otros estudios, el empleo de acetonitrilo como disolvente no puede aplicarse a la combinación de sílice con H_2SO_4 (40:60) ya que el ácido provocaría la degradación (oxidación) del mismo [684], estableciéndose por tanto que la extracción con sílice acidificada sólo se evaluará con la elución con diclorometano.

En este ensayo se efectuaron las extracciones por duplicado para cada una de las combinaciones posibles entre disolventes y adsorbentes. Se homogeneizaron en un mortero de vidrio 0,5 g de muestra (mejillón) y 1 g de C_{18} empleado como soporte sólido (agente dispersante). Posteriormente, se procedió al llenado de la jeringa donde tendrá lugar de forma simultánea la elución de los analitos y la limpieza de la muestra. Para ello, se situó una frita de 20 μm en la base de la jeringa, adicionando justo encima 1 g de sulfato sódico anhidro para realizar la deshidratación de los extractos. En un segundo nivel se disponen 2 g de los distintos adsorbentes seleccionados para este estudio. Por último, se situó la mezcla previamente homogeneizada de la muestra con el soporte sólido en la zona superior, a la que se le adicionaron 50 ng g^{-1} de los compuestos de interés, cubriendo todo con una segunda frita para evitar la flotación de las partículas contenidas en la jeringa. Una vez dispuestos todos los reactivos en el interior del cartucho se procede a la elución de los analitos con 10 mL del disolvente.

Tras recolectar el eluato que contiene los analitos, se procede a la concentración de los mismos hasta un volumen aproximado de 0,5 mL bajo corriente de nitrógeno en el Turbo-Vap y llevando posteriormente a sequedad en el Mini-Vap. Finalmente, el extracto se reconstituye con 0,5 mL de metanol/agua (1:1).

Tabla IV.22. Eficacia relativa (%) de los PFASs empleando diferentes combinaciones de disolventes y adsorbentes.

		PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFOS
Alúmina	ACN	4,5	0,5	1,3	1,2	1,1	1,7	0	55
	DCM	0,6	0,4	0,8	1,1	0,9	0	0	0
Florisil	ACN	46	40	42	42	41	42	49	100
	DCM	0	0	0	1,2	0,5	0,6	0	0
Sílica gel	ACN	100	100	100	100	100	100	100	84
	DCM	0	0	1	0,9	0,9	0	0	0
Sílica gel + H ₂ SO ₄	DCM	0	0	1,4	1,8	2	3,5	6	0

En la Tabla IV.22 se presentan los resultados comparativos de la eficacia relativa, asignando el 100 % a la combinación con la eficacia máxima obtenida. Tal y como se observa, el uso de disolventes relativamente poco polares como el DCM no logra la extracción de ninguno de los analitos (eficacias de extracción < 6 %), siendo el ACN el que proporciona mejores resultados para todas las combinaciones estudiadas. Según los datos presentados se puede ver cómo la alúmina provoca una fuerte retención de los analitos generando en consecuencia eficacias relativas bajas. Por otro lado, se aprecia claramente cómo la sílice proporciona las mejores recuperaciones de los analitos, con excepción del PFOS, al que también proporciona buenas extracciones el Florisil. Siendo por tanto, la combinación de ACN y sílice la que genera mejores resultados.

Selección del soporte sólido (agente dispersante)

Continuando con la optimización de la extracción de los compuestos de interés, debe seleccionarse también el soporte sólido más adecuado con el que efectuar la dispersión o la ruptura de la estructura de la matriz de la muestra, lo que facilita tanto la interacción entre el disolvente y la muestra, como la extracción de los analitos de la matriz previa a la elución con el disolvente [684]. Para ello, se seleccionaron cuatro de los agentes dispersantes más recurridos en otros estudios [684], como son el C₁₈, sílice, tierra de diatomeas y sulfato sódico anhidro, realizando también una prueba sin emplear ningún tipo de soporte sólido para comparar la efectividad del agente dispersante.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las extracciones se realizan por duplicado adicionando a la muestra (0,5 g mejillón) 50 ng g⁻¹ de los PFASs. El sistema de montaje de los diferentes materiales es similar al desarrollado en la sección anterior. Tras la disposición de la frita inicial se introducen 1 g de sulfato sódico anhidro, seguido de 2 g del agente adsorbente optimizado en la sección anterior (sílice) y de la mezcla homogeneizada, formada a partir de la molienda de 0,5 g de mejillón liofilizado junto con 1 g del correspondiente soporte sólido, situando por último una segunda frita en la cara superior. Los PFASs son eluidos de la columna con 10 mL de acetonitrilo seguidos de una etapa de evaporación hasta sequedad del disolvente bajo corriente de N₂ en el Turbo-Vap y en el Mini-Vap. El extracto final se reconstituye, al igual que en la sección anterior, con 0,5 mL de metanol/agua (1:1).

La Figura IV.47 muestra las recuperaciones obtenidas para cada analito con los diferentes soportes sólidos. Entre ellas se puede ver la mala eficacia de las extracciones realizadas sin emplear el soporte sólido o utilizando únicamente el sulfato sódico anhidro, con recuperaciones inferiores al 26 y 19 %, respectivamente, en donde queda clara la necesidad de emplear agente dispersante como sistema de ruptura de la muestra. Sin embargo, tras la similitud que ofrecen los otros tres soportes sólidos candidatos se podría escoger cualquiera de ellos para continuar con el estudio. Finalmente, se decidió optar por continuar la investigación empleando como soporte sólido la tierra de diatomeas, en base a su bajo coste en comparación con los otros dos candidatos.

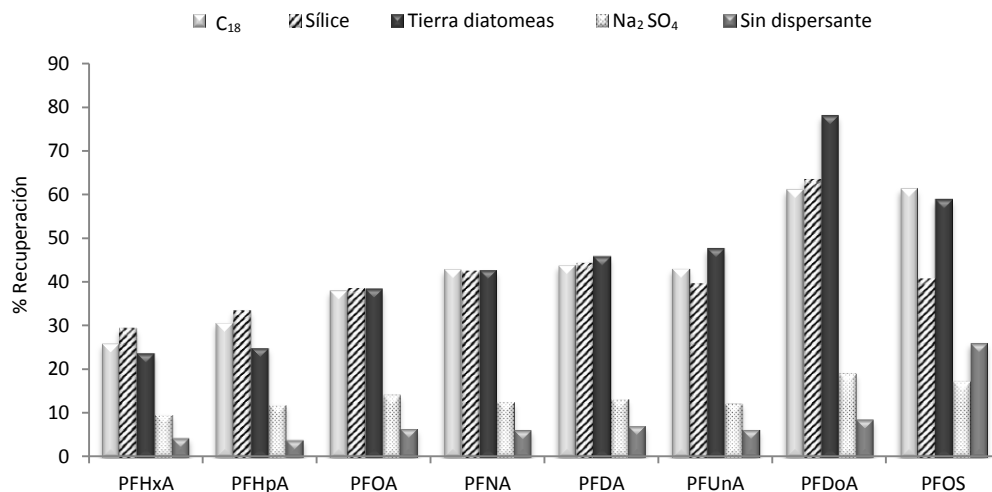


Figura IV.47. Recuperaciones (%) de los PFASs empleando diferentes soportes sólidos (agentes dispersantes).

Optimización de las cantidades de disolvente, soporte sólido y adsorbente

Una vez seleccionado el disolvente (ACN), el adsorbente (sílice) y el soporte sólido (tierra de diatomeas) se procede a realizar un estudio en profundidad con el fin de optimizar sus respectivas cantidades. Para ello, se decide emplear un diseño tipo Doehlert, que permite seleccionar diferentes niveles de estudio para cada factor [751,768,769], siendo en este caso: cinco niveles para el adsorbente (1 - 4 g), tres para el soporte sólido (0,2 - 1 g) y siete para el disolvente (5 - 25 mL). Por otro lado, este diseño experimental permite optimizar estos tres factores y sus diferentes interacciones con 15 experimentos. La Tabla IV.23 muestra el plan experimental donde se recogen las diferentes combinaciones de los factores estudiados.

Tabla IV.23. Dominio experimental y plan de experimentación del diseño.

CONDICIONES	ADSORBENTE (g)	DISOLVENTE (mL)	SOPORTE SÓLIDO (g)
Material	Sílice	ACN	Tierra de diatomeas
Nivel bajo	1	5	0,2
Nivel alto	4	25	1
EXPERIMENTO	ADSORBENTE (g)	DISOLVENTE (mL)	SOPORTE SÓLIDO (g)
1	4,0	15	0,6
2	1,0	15	0,6
3	3,3	25	0,6
4	1,8	5	0,6
5	3,3	5	0,6
6	1,8	25	0,6
7	3,3	18	1,0
8	1,8	12	0,2
9	3,3	12	0,2
10	2,5	21	0,2
11	1,8	18	1,0
12	2,5	9	1,0
13	2,5	15	0,6
14	2,5	15	0,6
15	2,5	15	0,6

Los experimentos para estas pruebas se efectuaron con muestras de 0,5 g de mejillón con adición de analitos a 50 ng g⁻¹, empleando las cantidades de los tres parámetros a estudiar que se recogen en la Tabla IV.23, llevando los eluatos a sequedad

bajo corriente de N₂ y reconstituyendo en un volumen final de 0,5 mL de metanol/agua (1:1).

Una vez finalizados los experimentos, los resultados, definidos como áreas de los analitos, fueron analizados por medio del programa informático Statgraphics Centurion. Tal y como se recoge en la Tabla IV.24, la cantidad de adsorbente utilizado no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo sobre ninguno de los analitos; sin embargo, a todos ellos les afecta de forma positiva, a excepción del PFHxA. Del mismo modo, el soporte sólido no es un factor estadísticamente significativo, afectando de forma negativa a la extracción de los analitos, exceptuando el PFHxA. Sin embargo, el término de segundo orden asociado con este factor (CC) sí resultó ser estadísticamente significativo (negativo) para PFHxA, lo que significa que la respuesta proporcionada por el soporte sólido no sigue un comportamiento lineal, es decir, se logran mayores áreas a niveles intermedios (Figura IV.48). Por último, el volumen de disolvente ejerce una influencia estadísticamente significativa positiva sobre la mayor parte de los analitos. Además, para el PFHxA, el término cuadrático (BB) también afecta de modo estadísticamente significativo, lo que de nuevo representa un comportamiento no lineal (Fig. IV.48), que alcanza mayores áreas a volúmenes de ACN cerca del nivel alto (20 - 25 mL). Por último, los términos de interacción entre los diferentes factores no resultan significativos para ninguno de los analitos.

Tabla IV.24. Importancia relativa (con sus signos) de los efectos principales de los factores y de las interacciones de segundo orden en el diseño Doehlert.

FACTORES	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFOS
A: adsorbente	-	+	+	+	+	+	+	+
B: disolvente	++	++	+	++	++	++	+	+
C: soporte sólido	+	-	-	-	-	-	-	-
AA	+	+	+	-	-	-	-	-
BB	--	-	-	-	-	-	-	+
CC	--	-	+	+	+	+	+	+
AB	+	-	+	+	+	+	+	+
AC	+	-	-	-	-	-	-	-
BC	-	-	+	+	+	+	+	+

+ o - indican que el efecto no es estadísticamente significativo y ++ o -- indican un efecto estadísticamente significativo (95 % de nivel de confianza), positiva o negativa, respectivamente.

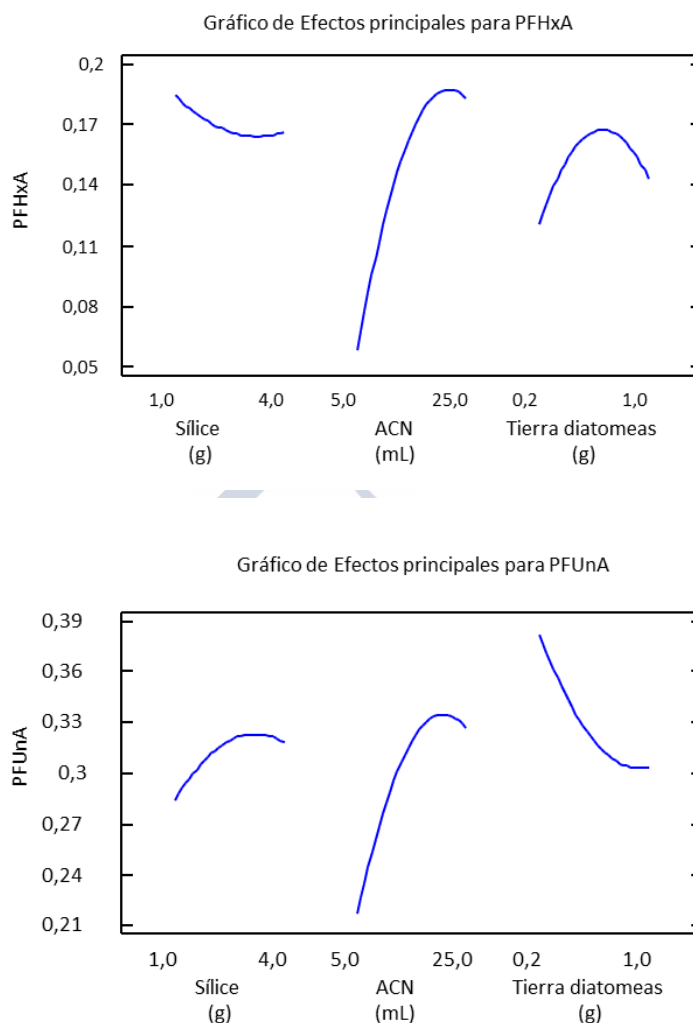


Figura IV.48. Gráfico de efectos principales del PFHxA (superior) y PFUnA (inferior) obtenidos tras el análisis del diseño Doehlert.

La selección de las condiciones óptimas de extracción para los analitos se realizó por medio de una optimización multicriterio con funciones de deseabilidad, en la que se busca el máximo de la función de deseabilidad global [749,753].

La Figura IV.49 presenta las tres gráficas de las funciones de deseabilidad global, en las que se fija una de las variables y se observa la influencia que ejercen las otras dos. Se puede apreciar cómo se logran las condiciones óptimas al emplear elevados volúmenes de ACN (22,5 mL), niveles elevados de adsorbentes (4 g) y los niveles bajos de soporte sólido (agente dispersante, 0,2 g).

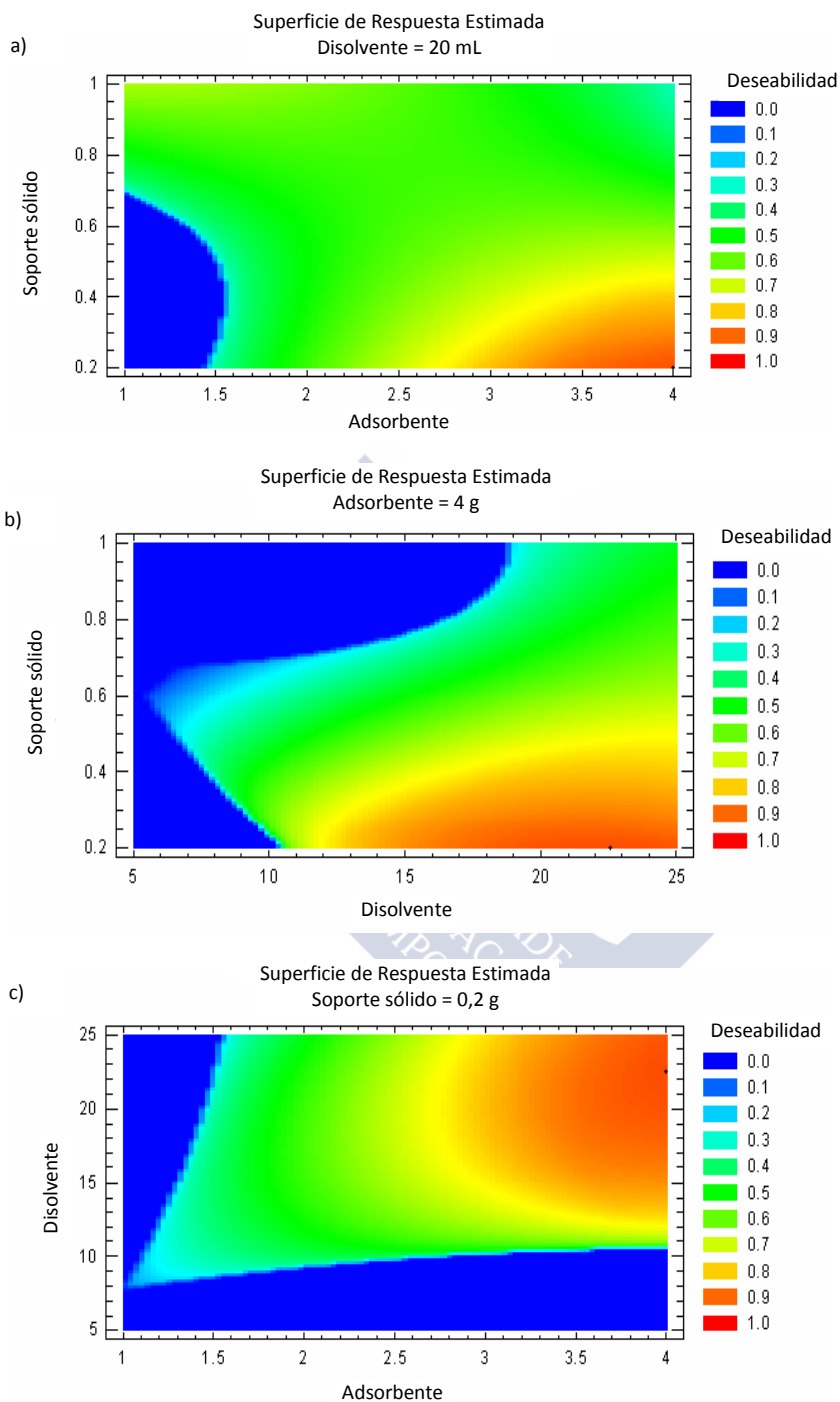


Figura IV.49. Gráficas de superficie de respuesta estimada de a) cantidad de soporte sólido (tierra de diatomeas) frente a adsorbente (sílice) con volumen fijo de 20 mL de disolvente (ACN); b) soporte sólido frente a disolvente con cantidad fija de 4 g de adsorbente; c) disolvente frente adsorbente con cantidad fija de 0,2 g de soporte sólido.

Finalmente, por razones prácticas el volumen de disolvente se fijó en 20 mL, considerándose aceptable puesto que proporciona valores de deseabilidad igualmente satisfactorios. Por tanto, se establecieron como condiciones óptimas: 4 g de adsorbente (sílice), 20 mL de disolvente (ACN) y 0,2 g de soporte sólido (tierra de diatomeas).

Estudios de las pérdidas en el proceso de evaporación, reconstitución del extracto y filtración

Bajo las condiciones optimizadas previamente para MSPD se lograron eficacias de extracción de los analitos comprendidas entre un 20 y un 40 %, consideradas bajas puesto que se trata de una técnica de extracción cuantitativa. Por tanto, se realizaron diversos estudios para evaluar las posibles pérdidas de los analitos durante la preparación de la muestra, principalmente durante la etapa de evaporación y filtración previa a la inyección.

Se efectuó un primer estudio donde se evaluó la influencia de la matriz de la muestra durante la evaporación y de la propia evaporación sobre la recuperación de los analitos. Para ello, se realiza un estudio comparativo de las recuperaciones obtenidas tras la extracción por triplicado (bajo condiciones óptimas) de muestras de mejillón sin adición, adicionando los compuestos (50 ng mL^{-1} en extracto final) en el momento previo a la etapa de evaporación con Turbo-Vap, reconstituyendo hasta un volumen final de 0,5 mL de metanol/agua (1:1); frente a las recuperaciones obtenidas tras la evaporación de 20 mL de ACN con la adición de los compuestos (50 ng mL^{-1} en extracto final) bajo las mismas condiciones, es decir sin la etapa de extracción de la muestra.

En la Figura IV.50 se recogen los resultados obtenidos para ambas pruebas y se puede ver cómo los resultados siguen siendo igual de bajos (inferiores a un 47 %) para ambos casos, lo que confirma la pérdida de los analitos principalmente en la etapa de evaporación, descartando la influencia negativa de la matriz de la muestra o de los componentes que participan en la extracción en la jeringa, demostrando que la presencia de la matriz disminuye las pérdidas que puedan tener lugar durante el proceso de evaporación.

A continuación, se realiza un estudio para comprobar la posible influencia del volumen final de evaporación, evitando así llevar los extractos a sequedad, mediante la extracción por duplicado de muestras de mejillón (0,5 g) adicionando 50 ng mL^{-1} de los analitos antes de iniciar la etapa de evaporación y realizando todos los lavados de las etapas intermedias con metanol. Los extractos se evaporaron en el Turbo-Vap hasta un volumen

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aproximado de 1 mL, llevándose después en el Mini-Vap hasta los siguientes volúmenes finales: 0,1, 0,2, 0,5 y 1 mL directamente sin llegar a sequedad.

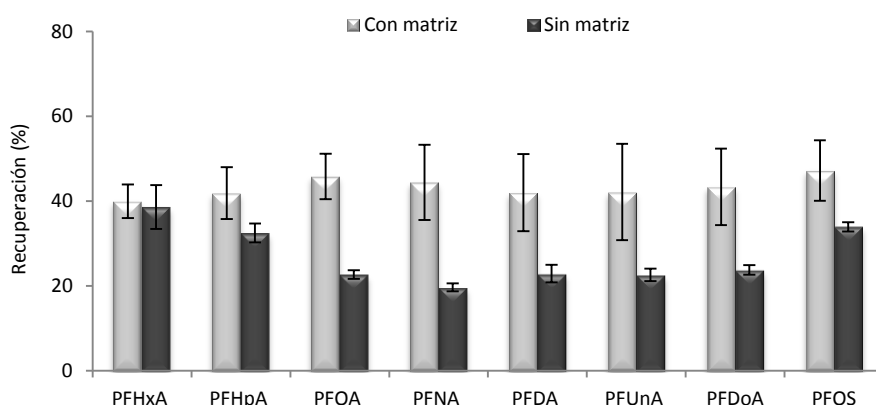


Figura IV.50. Recuperaciones (%) con desviación estándar de los analitos mediante la extracción con matriz y sólo con la etapa de evaporación.

La Figura IV.51 representa un gráfico de barras con los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analito en función de los diferentes volúmenes finales. Se aprecia claramente cómo a medida que se incrementa el volumen final del extracto, principalmente hasta 0,5 mL, se logra un aumento destacado de la recuperación para cada analito. Aunque un volumen final de 1 mL genera recuperaciones ligeramente superiores a 0,5 mL, se decide seleccionar 0,5 mL como volumen final, puesto que mayores volúmenes provocarían un aumento no deseado de los LODs.

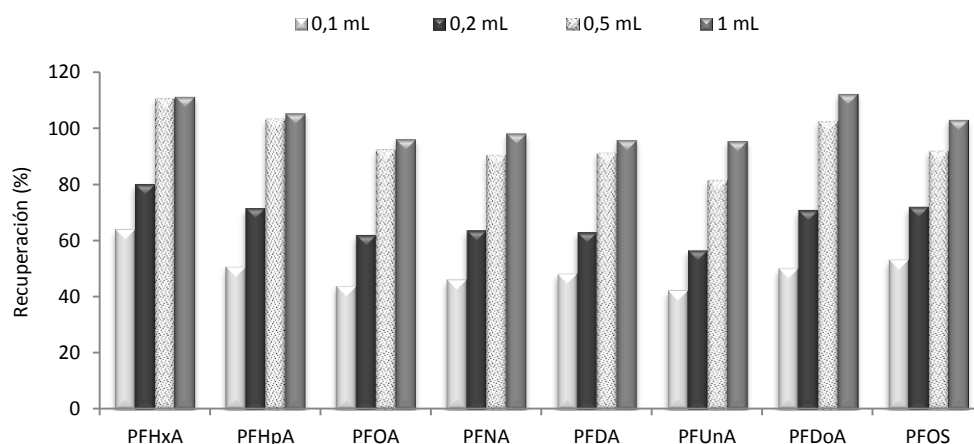


Figura IV.51. Recuperaciones (%) de los analitos evaluando diferentes volúmenes finales empleando MeOH para los lavados.

Se plantea la posibilidad de efectuar los lavados con ACN, en vez de con metanol, para continuar con el mismo disolvente que se emplea en la elución. Sin embargo, tal y como se puede ver en la Figura IV.52 las recuperaciones son algo inferiores a las obtenidas cuando se realizan los lavados con metanol (Figura IV.51). Por tanto, se decide mantener como disolvente de lavado el metanol.

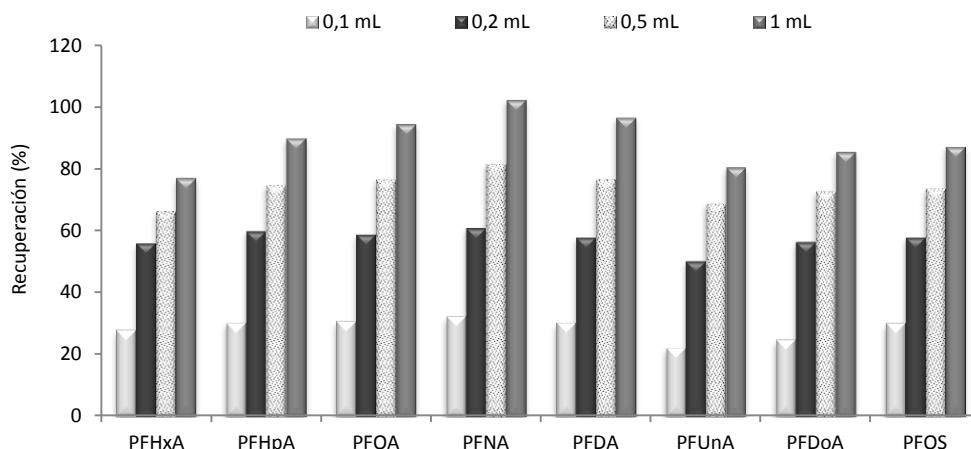


Figura IV.52. Recuperaciones (%) de los analitos evaluando diferentes volúmenes finales empleando ACN para los lavados.

2.5.3 Caracterización analítica del método

La validación del método desarrollado se presenta por medio de una evaluación de los efectos de matriz y de los estudios de linealidad del equipo cromatográfico (Sección IV.1.2.2), precisión, exactitud junto con los valores de LODs y LOQs. A lo largo de esta sección se presentarán los resultados detallados de cada uno de ellos.

Efectos de matriz

Como se comentó previamente en investigaciones anteriores, uno de los principales inconvenientes que presenta la LC-MS empleando API, es la supresión de la señal que tiene lugar durante el proceso de ionización debido a los componentes que pueden encontrarse en la matriz de la muestra.

Los efectos de matriz del sistema (%) fueron calculados de acuerdo con la Ecuación 4, determinándose la presencia o no de los mismos mediante la proximidad al 100 %, puesto que ese valor correspondería al patrón de la misma concentración. Los resultados superiores al 100 % implican un incremento de la señal mientras que inferiores al 100 % implican una supresión de la misma [754,755].

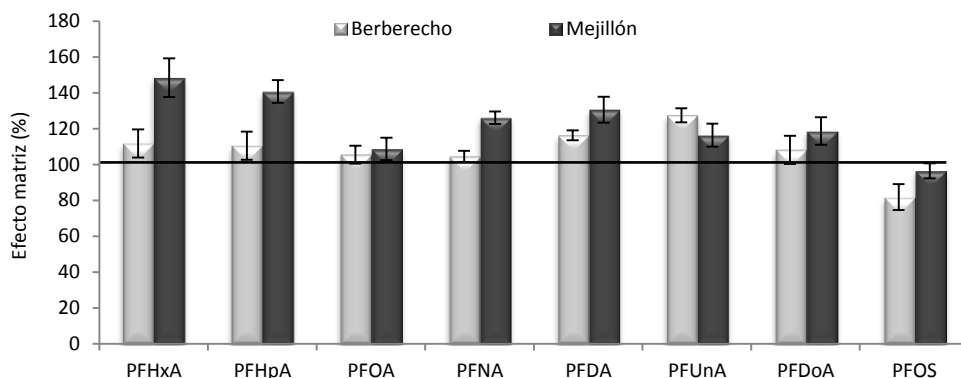


Figura IV.53. Efectos de matriz (%) para muestras de berberecho y mejillón.

La estimación de los efectos de matriz en el sistema se realizó mediante la diferencia entre la respuesta generada por una muestra, en este caso evaluado para dos (berberecho y mejillón) extraídas por triplicado con el método recién optimizado con adición de los analitos a 200 ng mL^{-1} sobre el extracto y otra sin adición, frente a un estándar con el mismo nivel de concentración. Los efectos de matriz, presentados en porcentaje, se presentan en la Figura IV.53, donde se puede ver en el caso del berberecho cómo los efectos de matriz no son muy relevantes con resultados comprendidos entre 80 y 120 %, mientras que para los mejillones sólo se observan efectos de matriz destacables para el PFHxA y el PFHpA. Sin embargo, estos efectos de matriz se corrigen satisfactoriamente mediante el uso de los correspondientes ISs, excepto para el PFHpA que se compensa con el análogo del PFOA.

Exactitud y precisión

La exactitud del método analítico desarrollado se evalúa por medio del estudio de las recuperaciones obtenidas para cada analito en mejillones, almeja y berberecho. El estudio de la precisión se realizó por medio de un estudio de la repetibilidad, expresada como RSD (%). Con este fin, se realizan cuatro extracciones bajo las condiciones optimizadas en la Sección IV.2.5.2 recogidas a modo resumen en la Sección III.3.5. Normalmente, el estudio de la exactitud en muestras sólidas debería realizarse mediante el

uso de un CRM, sin embargo, en el caso de no disponer de este material y de acuerdo con la Decisión 2002/657/EC [756], pueden emplearse muestras fortificadas con los analitos de interés como posible alternativa a la hora de realizar el cálculo de la exactitud. En este caso, se extraen muestras con una concentración de 50 ng g^{-1} de los compuestos de interés y con 20 ng g^{-1} de ISs.

Las recuperaciones obtenidas tras la corrección con los respectivos ISs se recogen en la Tabla IV.25, en los que se pueden observar valores de recuperación relativa comprendidos entre un 64 y un 126 %. En la misma tabla también se muestran recogidos los valores de las RSDs de las muestras, obteniendo niveles de reproducibilidad para las muestras de mejillón y almeja comprendidos entre un 3 y un 11 %, mientras que para el berberecho se consiguen resultados algo superiores entre un 10 y un 16 %.

Tabla IV.25. Recuperaciones relativas (%) (RSD) para mejillón, almeja y berberecho, y LODs y LOQs (ng g^{-1}) referidos a dw y ww del método MSPD-LC-MS/MS para los PFASs.

COMPUESTOS	% RECUPERACIÓN RELATIVA (RSD)			LOD (dw) (ng g^{-1})	LOD (ww) (ng g^{-1})	LOQ (dw) (ng g^{-1})	LOQ (ww) (ng g^{-1})
	MEJILLÓN	ALMEJA	BERBERECHO				
PFHxA	113 (8)	88 (11)	116 (13)	0,08	0,016	0,26	0,052
PFHpA	100 (6)	64 (8)	108 (14)	0,08	0,016	0,25	0,05
PFOA	105 (8)	71 (8)	121 (14)	0,22	0,044	0,74	0,15
PFNA	110 (9)	70 (14)	126 (11)	0,29	0,058	0,96	0,19
PFDA	103 (7)	114 (17)	114 (16)	0,05	0,01	0,16	0,032
PFUnA	116 (11)	85 (7)	125 (10)	0,09	0,018	0,18	0,036
PFDoA	97 (10)	65 (3)	112 (15)	0,18	0,036	0,59	0,12
PFOS	98 (5)	83 (8)	92 (16)	0,20	0,04	0,68	0,14

Se decidió comparar el método desarrollado de MSPD empleando una muestra ($n=3$) envejecida de mejillón (50 ng g^{-1} de PFASs) frente a los resultados obtenidos con la extracción por par iónico usada como método de referencia [636]. Para ello, se cubrió una muestra de mejillón con metanol y se le adicionaron los compuestos a un nivel de 50 ng g^{-1} de PFASs. Se procedió a una agitación manual cada pocas horas hasta la evaporación total del disolvente a temperatura ambiente situándolo en una campana extractora (4 días). Tras ello se conservó la muestra durante un mes antes de poder utilizarla para el análisis. Como se recoge en la Tabla IV.26, ambas técnicas obtienen concentraciones que no se consideran estadísticamente diferentes (*Student's test*, $p=0,05$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV.26. Concentración ($\bar{x} \pm SD$, ng g^{-1} dw) de muestra con adición (50 ng g^{-1}) envejecida mediante extracción por el protocolo recién optimizado de MSPD frente a los resultados obtenidos empleando el método de extracción por par iónico [636].

ng g^{-1}	MSPD	EXTRACCIÓN PAR IÓNICO
PFHxA	68 ± 12	82 ± 19
PFHpA	38 ± 2	46 ± 5
PFOA	33 ± 4	44 ± 2
PFNA	37 ± 4	40 ± 2
PFDA	40 ± 2	45 ± 3
PFUnA	42 ± 2	42 ± 5
PFDoA	38 ± 5	44 ± 4
PFOS	29 ± 8	33 ± 6

A continuación, se presenta en la Figura IV.54 un cromatograma de una muestra de berberecho con adición de los analitos a un nivel de 50 ng g^{-1} y al mismo tiempo una muestra de berberecho sin adición.

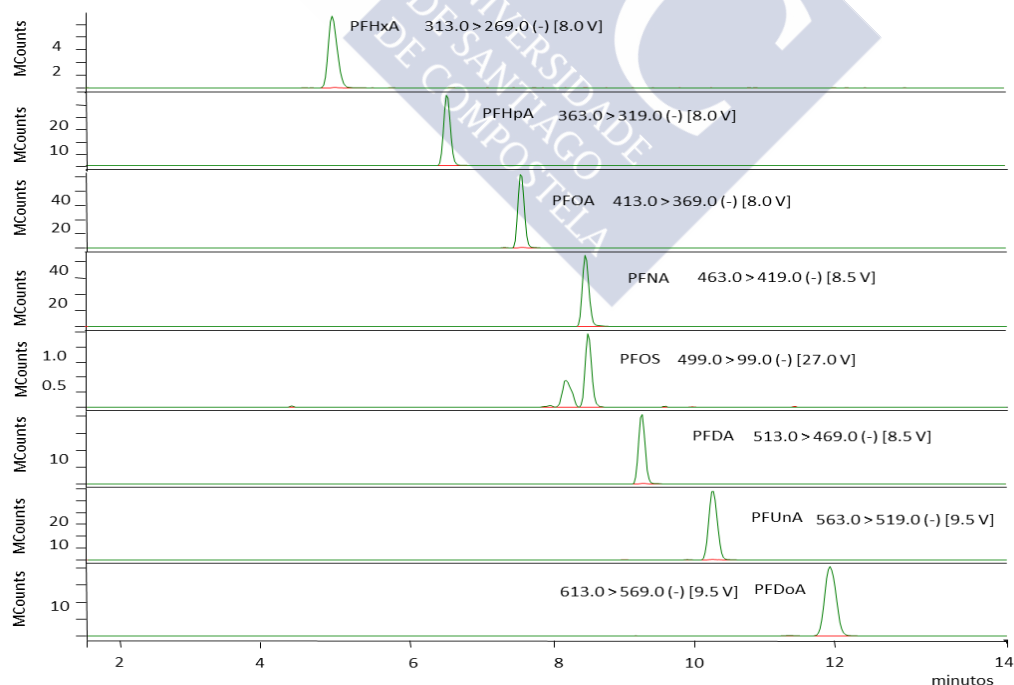


Figura IV.54. Cromatograma de muestra de berberecho con adición a 50 ng g^{-1} (línea verde) y berberecho sin adición (línea roja) para los PFASs.

LODs, LOQs y estudio de blancos

Como último punto del proceso de validación del método analítico (MSPD-LC-(ESI)-MS/MS(QqQ)) se procede a la determinación de los LODs y LOQs de cada uno de los analitos de interés. En este caso, tras comprobar la ausencia de blancos de extracción, el cálculo se realiza definiendo el LOD como 3 veces la relación S/N y el LOQ como 10 veces la S/N a partir de una muestra de berberecho con adición de los analitos. En la Tabla IV.25 se recogen los diferentes LODs y LOQs calculados para los analitos referidos al peso seco, y posteriormente se extrapolaron a peso húmedo, considerando un 80 % de humedad de media en las muestras frescas de moluscos, facilitando así la futura comparación con otros estudios de la bibliografía.

Los valores de LODs obtenidos en peso seco se encuentran comprendidos entre 0,05 y 0,29 ng g⁻¹ y los LOQs desde 0,16 y 0,96 ng g⁻¹. En cuanto a peso húmedo, los LOQs comprenden desde 0,032 hasta 0,19 ng g⁻¹. Estos niveles obtenidos son comparables a los encontrados en la bibliografía para los PFASs en muestras en peso seco de pescados [327,343,725] y moluscos [340], con la ventaja de que en este caso se trata de un procedimiento de extracción sencillo y económico.

2.5.4 Aplicación a muestras reales

El último punto en esta investigación consiste en aplicar el método desarrollado para detectar y cuantificar los posibles PFASs que se encuentren presentes en diversas muestras de moluscos. Los detalles en cuanto al período de recolección y el tipo de muestra empleada en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.2.

Las extracciones de las muestras se realizan por triplicado bajo las condiciones optimizadas a lo largo de esta investigación, recogidas a lo largo de la Sección IV.2.5.2 y de forma esquemática en la Sección III.3.5. Los diferentes resultados de las concentraciones en peso seco y húmedo se muestran recogidos en la Tabla IV.27 y en la Tabla IV.28, respectivamente. Algunos de los compuestos, como PFOA, PFDA o PFDoA, no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas. Por otro lado, los analitos más polares como el PFHxA y PFHpA fueron detectados en dos de las muestras con niveles comprendidos entre 0,27 y 2,0 ng g⁻¹ dw. También se detectaron algunos analitos de cadena ligeramente más larga como el PFNA y el PFUnA en tres de las muestras analizadas, alcanzando concentraciones de hasta 3,8 ng g⁻¹ dw y 8,3 ng g⁻¹ dw, respectivamente. En cuanto al PFOS, fue detectado únicamente en las dos muestras de almejas, con valores inferiores al LOQ en

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

una de ellas y con niveles de $7,3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ en la otra. Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios realizados en organismos marinos se realizaron en peces y son algo escasos los orientados a la determinación de los PFASs en moluscos. Destacan entre los pocos estudios en bivalvos, el desarrollado por Pan et al. [340] donde se obtienen niveles bastante similares a los presentados en estas tablas. Por otro lado, Gómez et al. realizaron un estudio con mejillones en el que detectaron PFOS en un par de muestras alcanzando concentraciones de hasta $0,06 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ [291]. Destaca sin embargo, los niveles de PFOS detectados por So et al. [341] en muestras de mejillones recogidos en las costas Japonesas, en las que el PFOS se detectó en todas las muestras analizadas llegando a alcanzar valores de hasta $5,8 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$; no obstante, los PFCAs los detecta con menor frecuencia aunque de nuevo con niveles ligeramente superiores a los recogidos en esta investigación, alcanzado hasta $4,3 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ del PFOA. En cuanto a muestras de pescados, los resultados obtenidos parecen ser bastante más variables y en algunos casos bastante superiores [327,328,343,770].

Aunque no se trate del mismo tipo de muestras, es importante destacar que los valores del PFOS presentados en las muestras de almejas son inferiores a los límites legales establecidos en la Directiva 2013/39/EU [266], en donde se establecen valores máximos de hasta $9,1 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ en peces.

Tabla IV.27. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) de PFASs en muestras reales.

ng g^{-1}	MEJILLÓN 1	MEJILLÓN 2	BERBERECHO	ALMEJA 1	ALMEJA 2
PFHxA	$2,0 \pm 0,6$	nd	nd	nd	$0,94 \pm 0,05$
PFHpA	$0,6 \pm 0,1$	nd	nd	nd	$0,27 \pm 0,04$
PFOA	nd	nd	nd	nd	nd
PFNA	nd	$3,1 \pm 0,2$	$3,5 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,4$	nd
PFDA	nd	nd	nd	nd	nd
PFUnA	nd	$8,1 \pm 0,6$	$8,0 \pm 2,3$	$8,3 \pm 1,1$	nd
PFDoA	nd	nd	nd	nd	nd
PFOS	nd	nd	nd	$7,3 \pm 2,9$	nc

nd: no detectable (<LOD)

nc: no cuantificable (<LOQ)

Tabla IV.28. Concentración ($\bar{x} \pm SD$, ng g^{-1} ww) de PFASs en muestras reales.

ng g^{-1}	MEJILLÓN 1	MEJILLÓN 2	BERBERECHO	ALMEJA 1	ALMEJA 2
PFHxA	$0,4 \pm 0,1$	nd	nd	nd	$0,19 \pm 0,01$
PFHpA	$0,12 \pm 0,02$	nd	nd	nd	$0,054 \pm 0,008$
PFOA	nd	nd	nd	nd	nd
PFNA	nd	$0,62 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,2$	$0,76 \pm 0,08$	nd
PFDA	nd	nd	nd	nd	nd
PFUnA	nd	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,2$	nd
PFDoA	nd	nd	nd	nd	nd
PFOS	nd	nd	nd	$1,5 \pm 0,6$	nc

nd: no detectable ($< \text{LOD}$)nc: no cuantificable ($< \text{LOQ}$)



2.6 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS RETARDANTES DE LLAMA EN AGUAS MEDIANTE AD/ABSORBENTES POLIMÉRICOS

2.6.1 *Introducción y objetivos*

El principal objetivo de este estudio consiste en desarrollar un método analítico para la determinación de algunos FRs en diversas muestras de aguas, tanto residuales como superficiales. Entre los diferentes FRs, este trabajo se centrará en el análisis de FRs clásicos, como son los PBDEs, junto con los NFRs fabricados como sustitutos de los PBDEs como consecuencia de los numerosos reglamentos y normativas que limitan y prohíben su uso. En base a los buenos resultados obtenidos en el anterior trabajo (determinación de PFASs en aguas empleando PES) se decide seleccionar la extracción con ad/absorbentes poliméricos de bajo coste como técnica de extracción de los analitos, puesto que, como se cita anteriormente, se trata de una técnica de microextracción de gran simplicidad del sistema de montaje, que permitiría trabajar con muestras no filtradas, que proporciona una mayor selectividad en cuanto a la extracción de los analitos proporcionando extractos más limpios, dónde se emplea un menor volumen de disolvente orgánico y un menor coste global en comparación con otras técnicas de extracción.

Dada la estructura que presentan los analitos del estudio se deciden realizar las etapas de separación y detección con un GC-MS(Q), empleando NCI como fuente de ionización, logrando así una detección sensible y selectiva que permite la identificación inequívoca de los compuestos de interés.

A modo de resumen, se recogen a continuación los objetivos del presente estudio:

- ✓ Optimización de las condiciones de extracción y desorción: selección del material polimérico a utilizar, disolvente y volumen de desorción, tiempo y mecanismo de desorción, selección del modificador orgánico, estudio de la fuerza iónica, volumen de muestra, tiempo de extracción y efectos de la filtración y centrifugación.
- ✓ Validación del método analítico: linealidad, precisión, exactitud, efectos de matriz, eficacia de extracción y LODs y LOQs
- ✓ Aplicación a muestras reales: agua de mar, río, ría, efluentes e influentes de estaciones depuradoras de aguas urbanas.

2.6.2 Optimización de la técnica de extracción

Selección del material extractante

En esta investigación se seleccionaron dos materiales poliméricos con diferentes propiedades: PDMS y PES. El PES es un polímero ampliamente utilizado que presenta propiedades polares, que se suele emplear como membrana en los tratamientos de hemodiálisis [771]; sin embargo, ha demostrado poseer aplicación en procesos de microextracción de contaminantes orgánicos de polaridad media-alta [597,623]. Por otro lado, el PDMS ha sido uno de los materiales más ampliamente utilizado en procesos de SPME o SBSE que presenta propiedades hidrofóbicas y buenos resultados en extracciones de compuestos orgánicos en aguas [598].

Teniendo en cuenta que los FRs son compuestos altamente lipofílicos que presentan un elevado poder de adsorción sobre diferentes materiales, pudiendo quedar retenidos sobre las paredes de los viales [612], es necesario añadir un modificador orgánico (metanol para este estudio) que varíe ligeramente la polaridad de la muestra para evitar este tipo de comportamiento. Aunque luego se estudiará con detalle su influencia, es preciso que se incluya desde un principio. Por tanto, para seleccionar el material extractante más adecuado para la extracción de los FRs se realiza un estudio comparativo entre ambos polímeros. Para ello, se realizaron extracciones por duplicado introduciendo en un vial de vidrio 20 mL de agua Milli-Q con un 10 % de metanol, 1 cm del correspondiente material polimérico (PES o PDMS), una barra de agitación magnética y adición de los analitos con una concentración en muestra de 500 ng L^{-1} . A continuación, la extracción se produce bajo agitación magnética durante 5 horas a 500 rpm. Tras este proceso, se retira el material polimérico y se introduce dentro de un inserto, efectuando dos desorciones consecutivas con 100 μL de isooctano durante 10 minutos sin sonicación. Los extractos se inyectan directamente en el sistema GC-(NCI)-MS(Q).

Se descarta inicialmente el PES como material extractante tras obtenerse eficacias de extracción muy bajas con valores comprendidos entre un 0,3 y un 1,6 %, teniendo en cuenta también la ineffectividad para extraer los compuestos más pesados como el BDE-209, TTBPP y DBDPE. El PDMS por el contrario proporciona resultados bastante satisfactorios (Figura IV.55) con eficacias de extracción significativamente superiores alcanzando niveles comprendidos entre un 18 y un 58 %, a excepción del DEHTBP y el BDE-209, cuyas eficacias de extracción son de un 9 y un 5 %, respectivamente. También se puede apreciar, la necesidad de un estudio posterior de la cantidad de disolvente orgánico empleado en la desorción, tras no lograr una extracción completa de los analitos empleando una única fracción de disolvente.

Las notables diferencias entre las eficacias de extracción obtenidas con ambos materiales poliméricos pueden ser explicadas en función de la naturaleza de los analitos. El carácter hidrofóbico característico de los analitos hace que presenten una mayor afinidad por el material polimérico de mayor hidrofobicidad, que en este caso es el PDMS. Por lo tanto, se decide seleccionar el PDMS como material extractante para continuar este estudio.

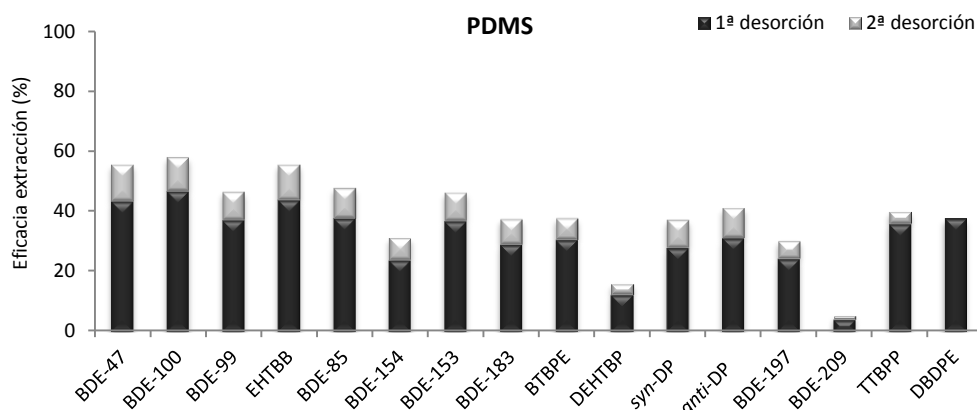


Figura IV.55. Eficacias de extracción (%) obtenidas para los FRs tras la extracción con PDMS.

Optimización de las condiciones de desorción

En este estudio se selecciona la desorción con disolventes como técnica de desorción de los analitos. A través de este procedimiento se pretende lograr una extracción máxima de los compuestos de interés desde el material polimérico que los contiene retenidos, aumentando así la cantidad de analito contenido en el extracto final. Por tanto, es necesario realizar un estudio detallado para la selección del disolvente y la cantidad correspondiente, junto a la necesidad o no de emplear algún mecanismo auxiliar para facilitar la desorción de los compuestos de interés.

A. Disolvente de desorción

El primer parámetro a evaluar es el disolvente orgánico a emplear, seleccionando para este estudio diversos disolventes relativamente apolares: hexano, tolueno, acetato de etilo, ciclohexano e iso octano.

Las extracciones se realizaron por duplicado con muestras de 20 mL agua Milli-Q (10 % metanol) y 500 ng L⁻¹ de concentración de los analitos en muestra, incorporando en la disolución una fibra de PDMS y una barra de agitación magnética. La extracción de los analitos se produce bajo una agitación magnética constante a 500 rpm durante 5 horas. Se realizaron tres desorciones consecutivas de 10 minutos cada una con 100 µL de cada disolvente seleccionado, inyectando directamente en el sistema GC-(NCI)-MS(Q). Se seleccionaron 100 µL puesto que es el volumen mínimo de disolvente que permite una completa inmersión del polímero en insertos de 200 µL. Sin embargo, siguiendo el siguiente orden de disolventes, hexano > ciclohexano > tolueno > isooctano > acetato de etilo, se aprecia un incremento del tamaño de la barra de PDMS dentro del vial causando una disminución del volumen del disolvente de desorción que se recupera al final del proceso que puede afectar a la precisión del método. Este efecto es más destacado cuando se emplean hexano, ciclohexano y tolueno. Por tanto, se decidió rechazar estos tres disolventes para realizar la desorción de los analitos. Por otro lado, tal y como se muestra en la Figura IV.56, se obtienen recuperaciones similares para los otros dos tipos de disolventes (acetato de etilo e isooctano). En cuanto a la cantidad de disolvente empleada, se puede ver cómo la mayor parte de los analitos son extraídos en la primera desorción, sin embargo, aún se presentan cantidades significativas en las dos últimas desorciones. Esto se estudiará en detalle en el siguiente punto, pero permite hacernos una idea del potencial de desorción bajo las condiciones fijadas. Finalmente, se selecciona el acetato de etilo como disolvente de desorción para los próximos experimentos puesto que al ser más volátil que el isooctano se podrá concentrar con mayor facilidad.

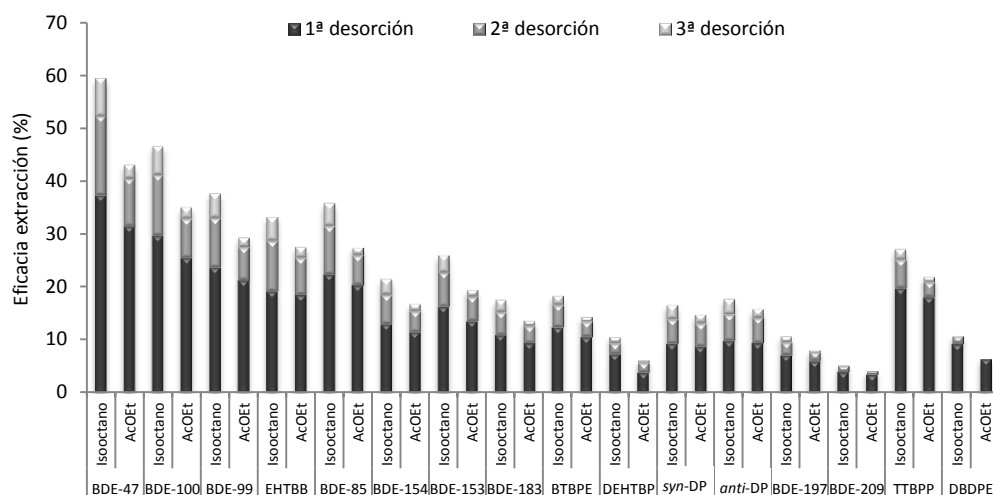


Figura IV.56. Eficacias de extracción (%) para los FRs empleando isooctano y acetato de etilo como disolventes de desorción y realizando tres desorciones consecutivas.

B. Tiempo de desorción y mecanismos auxiliares

Otros parámetros que juegan un papel muy importante en la desorción de los analitos son el tiempo necesario para realizar la desorción y si hay necesidad o no de utilizar algún mecanismo auxiliar que facilite la extracción de los analitos desde el material polimérico hacia el disolvente. En este caso, se evaluó el uso de sonicación o no como mecanismo auxiliar, realizándose con cada una de ellas desorciones de 5, 10 y 15 minutos.

La etapa de extracción de los analitos se realizó del mismo modo que en el punto anterior, mediante extracciones por duplicado con 20 mL de agua Milli-Q (10 % metanol) con 500 ng L⁻¹ de los analitos, introduciendo en el vial donde tiene lugar la extracción la fibra de PDMS y una barra agitadora magnética. La extracción se realizó durante 5 horas bajo agitación magnética a 500 rpm. En la etapa de desorción de los compuestos se estudió la posibilidad o no de usar la sonicación como mecanismo auxiliar, evaluando para cada uno de los modos los diferentes tiempos de desorción especificados anteriormente, realizando para cada combinación tres desorciones consecutivas con 100 µL de acetato de etilo. Finalmente, se retira el PDMS y se inyecta el disolvente directamente en el equipo GC-(NCI)-MS(Q).

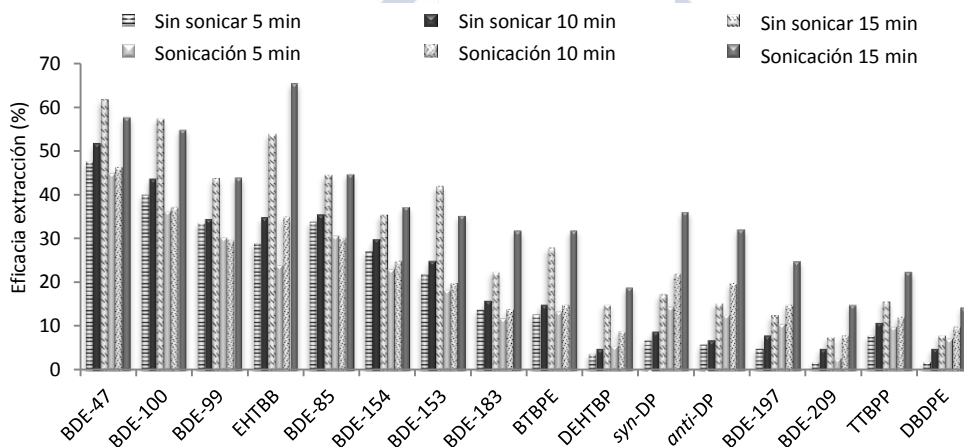


Figura IV.57. Eficacias de extracción (%) de los FRs evaluando de forma simultánea sonicación y tiempos de desorción, mediante desorción con tres fracciones (unificadas) de acetato de etilo.

Como se muestra en la Figura IV.57, las recuperaciones aumentan a medida que aumenta el tiempo de desorción, independientemente del uso o no de la sonicación. Sin embargo, para los analitos más lipofílicos sí se aprecian mejores resultados mediante la sonicación del vial. Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos se deciden seleccionar 15 minutos de sonicación como procedimiento para los próximos experimentos.

C. Volumen de disolvente

Como se puede ver en algunas de las secciones anteriores, la desorción de los analitos no se logra con una única etapa. Sin embargo, es necesario evaluar si se obtienen mejores resultados mediante una única desorción con 300 μL o con tres desorciones consecutivas con 100 μL .

Para ello, se realiza por duplicado el mismo procedimiento de extracción empleado en el punto anterior para muestras de 20 mL de agua Milli-Q (10 % metanol) con adición de analitos a 500 ng L^{-1} , y la desorción de los compuestos de interés bajo las condiciones recién optimizadas (acetato de etilo y 15 min sonicación) evaluando la desorción por triplicado con fracciones de 100 μL o una única extracción con 300 μL . El volumen final se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno en el Mini-Vap y se reconstituye en 50 μL de isooctano, manteniéndose en el congelador hasta su inyección en el GC-(NCI)-MS(Q).

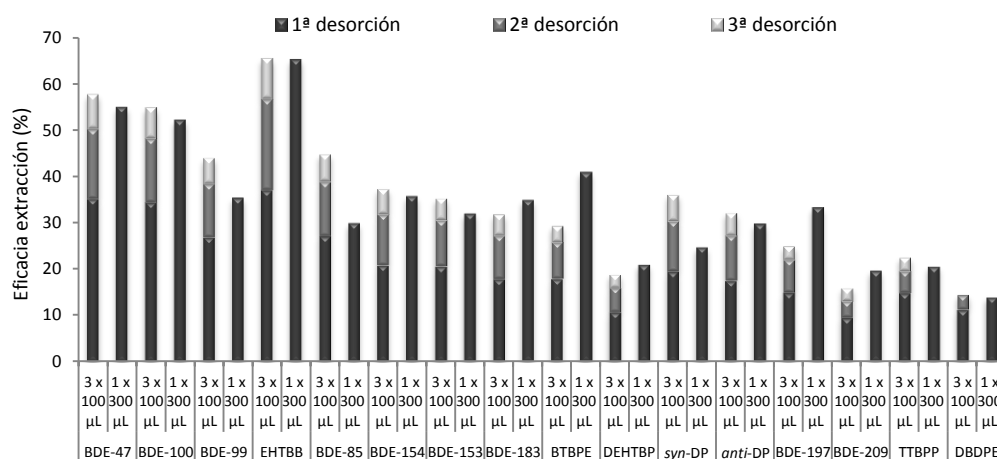


Figura IV.58. Eficacias de extracción (%) obtenidas para los FRs con diferentes volúmenes de desorción. Columna izquierda: 3 desorciones de 100 μL ; columna derecha: 1 desorción con 300 μL .

Como se puede ver en la Figura IV.58, 100 μL no son suficientes para lograr una desorción completa de los analitos, todavía se desorben en la segunda fracción una cantidad importante de los analitos y en menor medida en la tercera fracción. Por otro lado, no se aprecian diferencias significativas entre efectuar tres desorciones de 100 μL y efectuar una única desorción con 300 μL , por lo que, por razones prácticas se decidió continuar con una única desorción con 300 μL de acetato de etilo.

Optimización de las condiciones de extracción

Como se explica anteriormente en el trabajo de aplicación de polímeros (PES) para la extracción de PFASs en muestras de aguas, hay varios factores que pueden afectar en gran medida a la etapa de extracción en función de las características de los analitos. Por ello, a continuación se van a realizar estudios detallados de los más importantes, entre los que se encuentran la presencia de un modificador orgánico, la fuerza iónica de la muestra, el volumen de muestra y el tiempo de extracción.

A. Modificador orgánico

Como se adelantó al inicio de esta investigación, el modificador orgánico desempeña un papel muy importante en la extracción de los analitos, sobre todo cuando se trata de analitos altamente lipofílicos con tendencia a quedarse retenidos en las paredes de los viales [612]. Por ello, es importante añadir a la disolución un porcentaje de un disolvente orgánico que ayude a disminuir la polaridad de la muestra haciendo que los analitos permanezcan en disolución sin tendencia a quedar retenidos en las diferentes superficies. Con este objetivo, se evalúan diferentes porcentajes de modificador orgánico en muestra, desde 0 hasta un 40 %. No se estudian niveles superiores al 40 % puesto que, tras unos ensayos previos con diversos porcentajes, originan la precipitación de la sal en las muestras de agua salada.

Las extracciones se realizan por triplicado introduciendo en el vial de vidrio 20 mL de muestra (agua Milli-Q (500 ng L^{-1}) y los diferentes porcentajes de metanol a estudiar (0, 5, 10, 20, 30 y 40 %)), incorporando también la barra magnética y 1 cm de barra de PDMS. Las condiciones de extracción se mantuvieron como hasta ahora: 5 horas de agitación magnética constante (500 rpm) a temperatura ambiente. Finalmente, la desorción de los analitos se realiza en base a los resultados obtenidos a lo largo de la Sección IV.2.6.2, con una única desorción con 300 μL de acetato de etilo manteniéndose en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. Una vez finalizado, se retira el material polimérico con ayuda de unas pinzas y se concentra a sequedad el extracto bajo corriente de nitrógeno, para reconstituir finalmente con 50 μL de isooctano para su posterior inyección en el sistema GC-(NCI)-MS(Q).

La Figura IV.59 muestra las recuperaciones obtenidas para cada analito al variar el porcentaje del modificador orgánico. Tal y como se puede ver, no se aprecian diferencias significativas en las recuperaciones entre los porcentajes de modificador orgánico bajos (0 - 10 %) excepto para el DBDPE; sin embargo, se presenta un aumento importante de las

recuperaciones al aumentar el porcentaje de metanol empleado desde un 20 y hasta un 40 %. No obstante, algunos analitos como el BDE-47 y el DEHTBP no muestran apenas variaciones en sus recuperaciones, destacando la escasa influencia que el modificador orgánico ejerce sobre ellos. Finalmente, con base en los resultados presentados, se selecciona un 40 % de metanol como modificador orgánico en muestra.

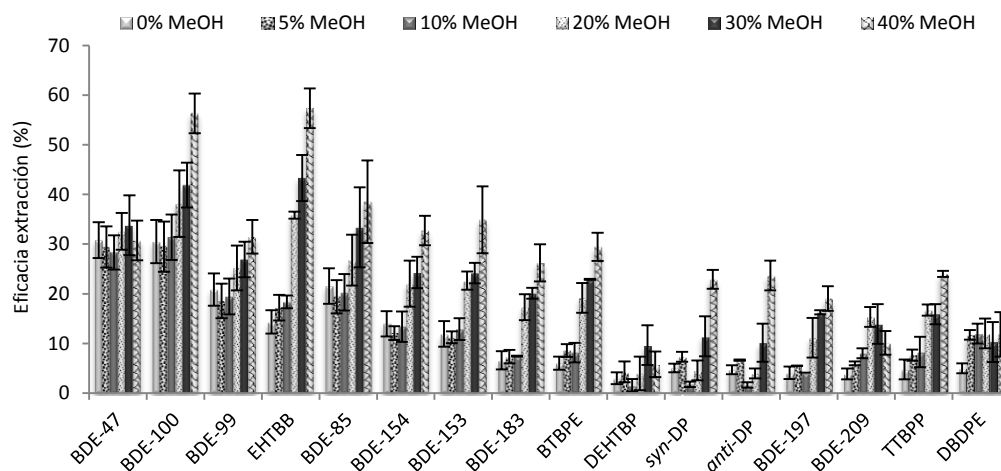


Figura IV.59. Eficacias de extracción (%) de los FRs con diferentes porcentajes de modificador orgánico (metanol) en muestra.

B. Efecto de la fuerza iónica

Otro parámetro de gran importancia que es necesario estudiar en detalle es la fuerza iónica de la muestra. El cloruro sódico es una de las sales empleadas con mayor frecuencia que permite modificar fácilmente la fuerza iónica de la disolución.

Antes de comenzar, se efectuó un pequeño estudio en el que se adicionaron diversos niveles de NaCl (%) a muestras de agua Milli-Q con un 40 % de metanol, comprobando que no se podrán evaluar niveles superiores al 10 % de NaCl sin riesgo de ocasionar la precipitación de la sal, seleccionando por tanto tres posibles porcentajes a evaluar para el estudio de este factor: 0, 5 y 10 % NaCl.

La extracción de los analitos tuvo lugar por duplicado introduciendo en el vial de extracción 20 mL de agua Milli-Q (500 ng L^{-1}) con un 40 % de metanol y los diferentes porcentajes de NaCl seleccionados previamente. A continuación, se incorpora la barra de agitación, el material extractante (PDMS) y se realiza la extracción durante 5 horas a

temperatura ambiente bajo agitación magnética constante a 500 rpm. Una vez finalizada esta etapa, se retira el PDMS con unas pinzas y se sitúa en el interior de un inserto donde se realizará la desorción de los analitos bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la anterior. Finalmente, se lleva el extracto a sequedad bajo corriente de N_2 en el Mini-Vap, reconstituyendo con 50 μ L de isooctano para su posterior inyección en el sistema GC-(NCl)-MS(Q).

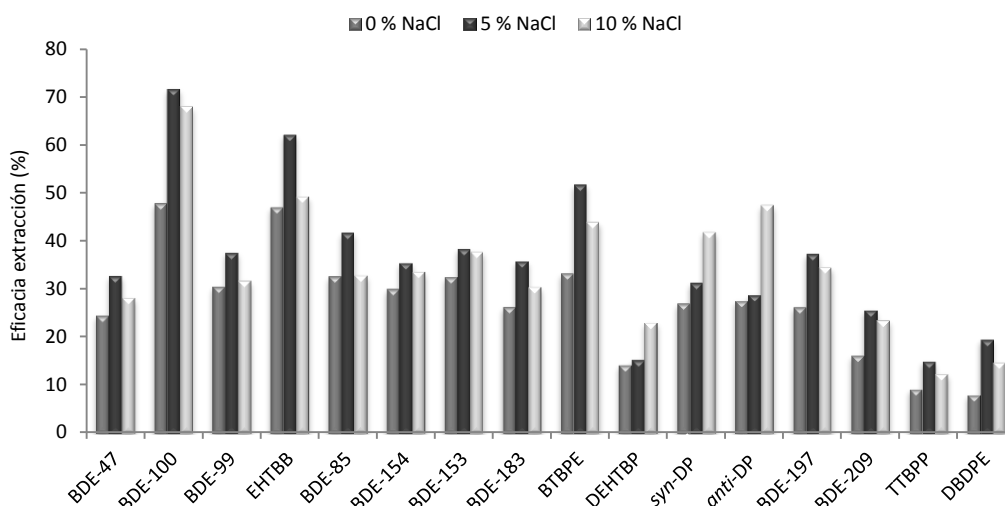


Figura IV.60. Eficacias de extracción (%) de los FRs con diferentes porcentajes de NaCl en el estudio de la fuerza iónica.

Como se puede ver (Figura IV.60), se aprecia un ligero aumento en las recuperaciones al emplear niveles de un 5 % de sal para todos los analitos; sin embargo, el uso de un 10 % conlleva para la gran mayoría de los analitos, a excepción de los isómeros del DP, una disminución de la recuperación. Finalmente, se decide fijar el porcentaje de NaCl en un 4 %, equivalente a un 6 % en muestra (similar a los niveles de salinidad del agua del mar de las costas gallegas), en combinación con un 40 % de metanol como condiciones óptimas de extracción. Se debe tener en cuenta que, para las muestras de agua de mar y ría no será necesario añadir NaCl.

C. Volumen de muestra

El volumen de muestra es otro de los parámetros que juega un papel muy importante en todas las técnicas de extracción, relacionándose con el poder de concentración de los analitos en el extracto final y permitiendo, por tanto, la disminución

de los LODs del método analítico. Para ello, se seleccionan tres posibles volúmenes de estudio de acuerdo con los viales de espacio de cabeza típicos: 10, 20 y 100 mL.

Se realizaron cuatro réplicas para cada uno de los volúmenes a evaluar, empleando para ello muestras de agua Milli-Q con adición de 10 ng de los analitos con un 40 % de metanol y un 4 % de NaCl. Se mantiene durante 5 horas bajo agitación magnética constante (500 rpm) a temperatura ambiente para extraer los analitos, realizando la desorción con 300 μ L de acetato de etilo durante 15 en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente. Los extractos se concentraron a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyeron con 50 μ L de isooctano para su inyección en el equipo GC-(NCI)-MS(Q).

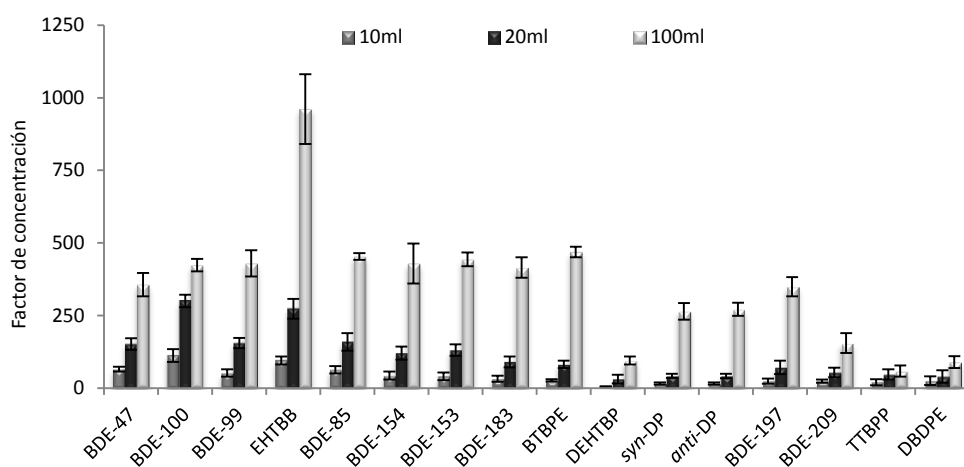


Figura IV.61. Factores de concentración obtenidos para los FRs con los diferentes volúmenes de muestra.

Los resultados de los experimentos se expresaron en función de los factores de concentración (Ecuación 2) de los analitos obtenidos para cada uno de los volúmenes estudiados, en donde se tiene en cuenta el volumen de muestra inicial, el volumen del extracto y las recuperaciones obtenidas.

La Figura IV.61 muestra un incremento de los factores de concentración con el aumento del volumen de muestra empleado para todos los analitos. En el caso de los PBDEs más ligeros se puede ver cómo el factor de concentración es similar para todos ellos cuando se emplean volúmenes de 100 mL de muestra. Sin embargo, aquellos analitos más pesados, principalmente BDE-209, y algunos NFRs (TTBP, DBDPE y DEHTBP), no presentan una diferencia tan notable en cuanto a este factor. Pese a ello, se seleccionaron volúmenes de muestra de 100 mL puesto que proporcionan mejores factores de concentración para todos los analitos, y por tanto maximizará la sensibilidad del método analítico desarrollado.

D. Tiempo de extracción

Como último paso en la optimización de la etapa de extracción, se procede a efectuar un estudio en profundidad del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de la extracción. Para ello, se realizaron extracciones por triplicado de muestras de 100 mL de agua Milli-Q con un 40 % de metanol y 4 % de NaCl con adición de los analitos a concentración de 100 ng L^{-1} , con la barra de PDMS y efectuando la extracción mediante agitación magnética a 500 rpm durante tiempos comprendidos entre 30 minutos y 24 horas. La etapa de desorción de los analitos se realizó empleando las condiciones optimizadas en la sección anterior, mediante una única desorción con 300 μL de acetato de etilo manteniéndose en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. Los extractos se llevaron a sequedad bajo corriente de N_2 en el Mini-Vap y se reconstituyeron con 50 μL de isooctano quedando así listos para su inyección en el sistema GC-(NCI)-MS(Q).

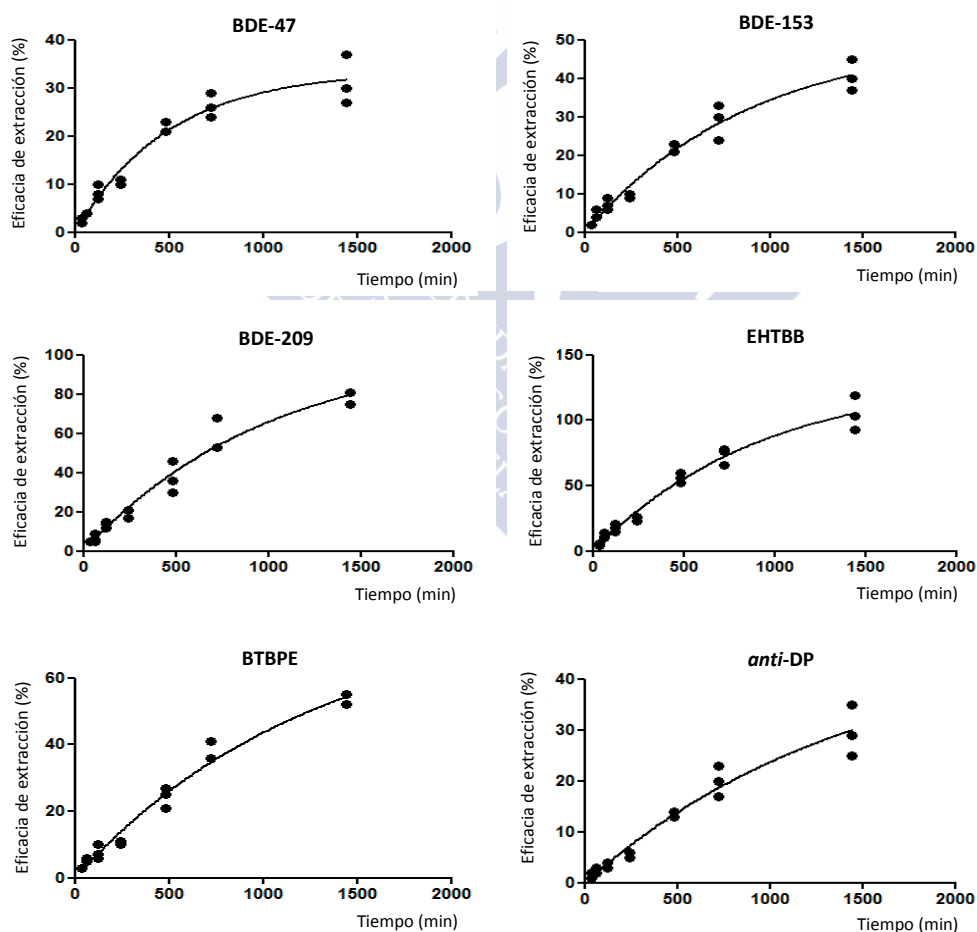


Figura IV.62. Perfiles de tiempos de extracción para BDE-47, BDE-153, BDE-209, EHTBB, BTBPE y anti-DP.

Los perfiles cinéticos obtenidos son muy similares para todos los analitos, observándose que no se logra alcanzar el equilibrio ni tan siquiera tras 24 horas de extracción, tal y como se puede ver en algunos de los compuestos que se recogen en la Figura IV.62. Montes et al. [620] tampoco lograron alcanzar el equilibrio en la extracción de la mezcla comercial *penta*-BDEs empleando PDMS como material extractante mediante una extracción en espacio de cabeza. Por tanto, en vista de los resultados se decide seleccionar un tiempo de extracción de 15 horas (toda la noche) como resultado de compromiso entre sensibilidad y tiempo. Aunque este tiempo de extracción es relativamente largo en comparación con otras técnicas de extracción, tiene la ventaja de que se pueden realizar tantas extracciones simultáneas como posiciones disponga la placa de agitación magnética sin necesidad de atención durante la noche, quedando así como un método simple y cómodo.

Filtración y centrifugación

Normalmente, la filtración suele ser la técnica más recurrida para eliminar las partículas sólidas o la materia orgánica coloidal que puede interferir con el procedimiento de extracción: principalmente aparición de efectos de matriz en el caso de extracciones de ad/absorción. Sin embargo, aumentar el número de pasos dentro del procedimiento de preparación de la muestra puede conllevar la pérdida de los analitos, principalmente cuando se analizan analitos hidrofóbicos, en donde las pérdidas pueden tener lugar en la etapa de filtración a consecuencia del elevado poder de adsorción en filtros o en las paredes de los recipientes de vidrio. Por tanto, se estudiarán a lo largo de esta sección los efectos de la eliminación de la materia orgánica mediante la evaluación de dos protocolos diferentes, mediante procesos de filtración y centrifugación.

Para evaluar cada uno de los casos se realiza un estudio comparativo de las respuestas obtenidas con muestras de influentes ($n=2$) con adición de los analitos a nivel de 250 ng L^{-1} directamente sobre la muestra, antes de la eliminación de la materia particulada en suspensión, empleando para ello procedimientos de filtración. Al mismo tiempo, se evalúa si la incorporación de metanol (40 %) en el recipiente colector de la muestra, es decir, antes de proceder a la filtración, podría reducir las pérdidas de los analitos. Ambos ensayos se compararon con los resultados obtenidos sin realizar pretratamiento siguiendo el protocolo de extracción optimizado previamente. No obstante, según lo recogido en la Figura IV.63 se puede apreciar cómo la realización de una etapa de filtración, incluso adicionando metanol para disminuir la adherencia de los analitos en las paredes del material, provoca pérdidas significativas de todos los analitos.

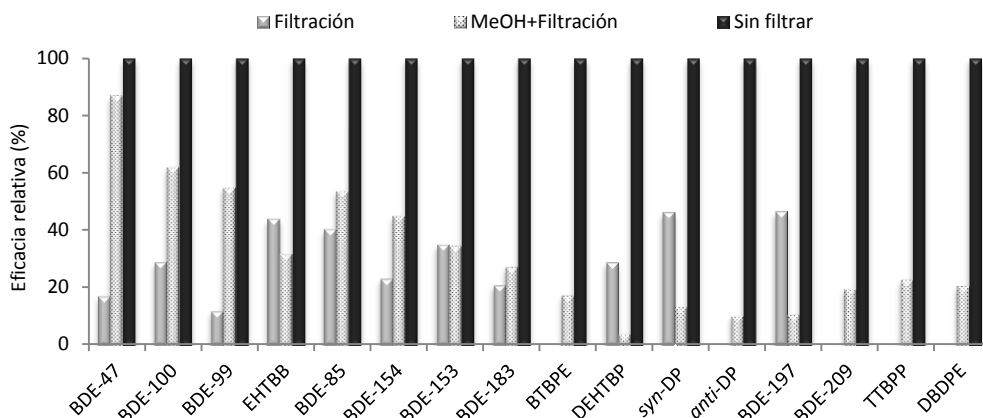


Figura IV.63. Eficacias relativas de extracción (%) obtenidas para los FRs en el estudio de las pérdidas de analitos en la etapa de filtración.

También se decidió evaluar la posibilidad de efectuar una etapa de centrifugación para lograr que la materia particulada se sedimente. Este estudio se realizó por duplicado con muestras de influente con adición de 250 ng L^{-1} de los compuestos de interés directamente sobre la muestra, antes o después de la centrifugación. Al igual que en el estudio de la filtración, se realizó al mismo tiempo un tercer ensayo, en el que se realiza la extracción sin realizar etapa de centrifugación, es decir, sin modificar el contenido de materia orgánica siguiendo en todo momento el procedimiento de extracción optimizado previamente. Según lo recogido en la Figura IV.64, se aprecia una clara reducción de la eficacia de extracción de los analitos confirmando la pérdida de los analitos durante la etapa de centrifugación. Del mismo modo que en el caso anterior, se evaluó el uso de metanol para reducir las pérdidas, no obstante, pese a la mejoría de los resultados, continúan siendo notablemente inferiores a los obtenidos sin realizar centrifugación. Por el contrario, sí se aprecia una mejoría en la extracción de los compuestos tras eliminar parte de la materia orgánica.

Los resultados muestran que tanto la filtración como la centrifugación conducen a una disminución significativa de la concentración de los analitos. La adsorción en los filtros, en las paredes de los viales o incluso en la materia particulada, debido a su baja solubilidad en agua, pueden ser explicaciones probables a este tipo de comportamiento. Finalmente, las muestras fueron analizadas directamente sin ningún tratamiento previo, lo que representa al mismo tiempo una ventaja en términos de ahorro de tiempo y de una menor manipulación de la muestra, comparado con otras técnicas de preconcentración como SPE. Por otro lado, esto puede conllevar al aumento de los efectos de matriz como consecuencia

de las cuantiosas especies presentes en la matriz de la muestra. Estos efectos de matriz se estudiarán de forma más detallada en la siguiente sección.

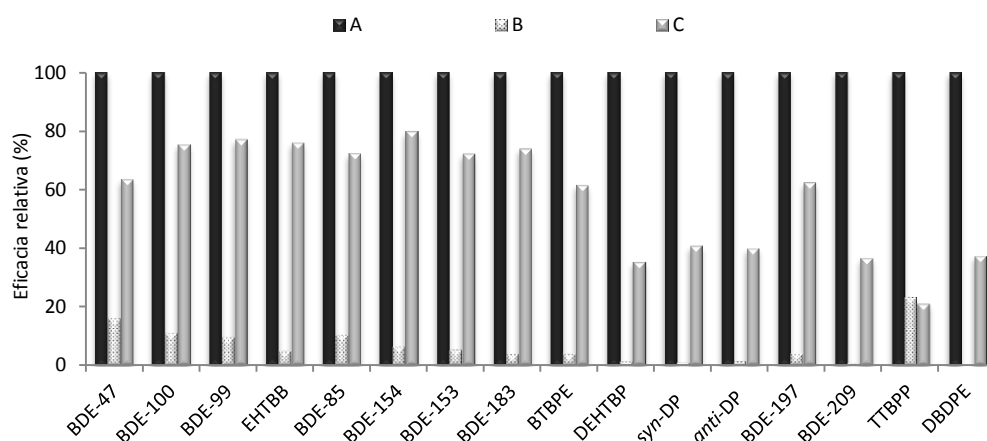


Figura IV.64. Eficacias relativas de extracción (%) obtenidas para los FRs en el estudio de las pérdidas de analitos en la etapa centrifugación. A: adición tras centrifugación, B: adición antes de centrifugación, C: sin centrifugar.

2.6.3 Caracterización analítica del método

Al igual que en otras investigaciones realizadas con técnicas de extracción no cuantitativas, la validación del método analítico se efectuará por medio de estudios de linealidad, precisión, eficacia de extracción, efectos de matriz y mediante los valores de LODs y LOQs.

Linealidad

El primer punto a estudiar es la linealidad del método analítico. Para ello, se realizan extracciones por duplicado con agua Milli-Q bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.6.2. Las extracciones se realizan a seis niveles de concentración de: 1, 5, 10, 50, 100 y 500 ng L⁻¹, empleando como ISs el BDE-77, BDE-181 y el ¹³C₁₂ BDE-209 (niveles de IS en muestra de 100 ng L⁻¹).

En el caso de los PBDEs, la selección del IS que va a corregir a cada analito se basa en lo recogido en la ISO 22032:2006 [680], a excepción del BDE-154 que se corregirá con el BDE-77 en base a los resultados obtenidos a lo largo de la validación del método. Por otro

lado, basándonos también en las recuperaciones relativas obtenidas con cada IS se seleccionó el BDE-77 como IS para la corrección del TTBPP, el BDE-181 para corregir al BTBPE, EHTBB, DEHTBP y al DBDPE. Por último, el $^{13}\text{C}_{12}$ BDE-209 corregirá a los isómeros del DP. En la Tabla III.12 recogida en la Sección III.2.3 se presentan las diferentes combinaciones de los ISs empleados para corregir a cada analito.

Tabla IV.29. Parámetros de las rectas de calibrado, factor de concentración (F.C.), eficacia de extracción, repetibilidad (RSD (%)), LODs y LOQs para el método de extracción con absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q), empleando PDMS como material extractante y tras la corrección con los correspondientes ISs (100 ng L⁻¹).

COMP.	CALIBRADO CON PATRÓN INTERNO	F.C.	% EFICACIA EXTRACCIÓN ± SD	RSD (%)		LODs (ng L ⁻¹)	LOQs (ng L ⁻¹)
				50 ng L ⁻¹	500 ng L ⁻¹		
BDE-47	y=0,007x-0,013 R ² :0,9998	324	27 ± 2	13	3	0,4	1,3
BDE-100	y=0,010x-0,018 R ² :0,9998	468	39 ± 1	12	3	0,6	2,0
BDE-99	y=0,009x-0,019 R ² :0,9999	384	32 ± 3	15	2	0,6	2,0
EHTBB	y=0,008x-0,002 R ² :0,9999	840	70 ± 6	18	15	1,3	4,3
BDE-85	y=0,007x-0,016 R ² :0,9998	324	27 ± 3	14	2	0,9	3,3
BDE-154	y=0,009x-0,013 R ² :0,9999	384	32 ± 3	16	5	0,7	2,3
BDE-153	y=0,016x-0,005 R ² :1,0000	372	31 ± 3	11	6	0,7	2,3
BDE-183	y=0,0066x+0,0009 R ² :0,9999	372	31 ± 4	14	4	2,2	7,3
BTBPE	y=0,003x-0,006 R ² :0,9999	456	38 ± 6	8	8	4,9	16,3
DEHTBP	y=0,001x-0,003 R ² :0,9997	180	15 ± 3	12	16	10,0	33,3
<i>syn</i> -DP	y=0,012x+0,059 R ² :0,9996	288	24 ± 3	18	15	0,4	1,3
<i>anti</i> -DP	y=0,007x+0,027 R ² :0,9996	300	25 ± 3	18	15	0,9	3,0
BDE-197	y=0,018x-0,042 R ² :0,9999	264	22 ± 2	15	9	0,6	2,0
BDE-209	y=0,001x+0,020 R ² :0,9999	168	14 ± 2	15	7	5,0	16,7
TTBPP	y=0,0002x-0,0010 R ² :0,9970	108	9 ± 1	22	13	7,0	23,3
DBDPE	y=0,0004x+0,0029 R ² :0,9992	108	9 ± 1	22	22	5,0	16,7

La Tabla IV.29 presenta los diferentes resultados obtenidos de la calibración para cada uno de los analitos mediante el método de calibración interna, alcanzando excelentes coeficientes de determinación superiores a 0,9992, excepto para el TTBPP (0,9970).

Precisión

Al igual que los estudios anteriores, la precisión del método se evaluó por medio de un estudio de la repetibilidad expresada como RSD, mediante una extracción simultánea de seis réplicas de agua Milli-Q a dos niveles de concentración de los analitos (50 y 500 ng L⁻¹) y con adición de los IS a 100 ng L⁻¹. Las extracciones se realizaron mediante la utilización de barras de PDMS bajo las condiciones optimizadas previamente a lo largo de la Sección IV.2.6.2 y que se presentan recogidas a modo resumen en la Sección III.3.6.

Las RSDs obtenidas (Tabla IV.29) para el nivel de 50 ng L⁻¹ se encuentran comprendidas entre un 8 y un 22 %, mientras que para el nivel de 500 ng L⁻¹ van desde un 2 a un 16 %, excepto el DBDPE con casi un 22 %. Estos valores se encuentran dentro de los rangos presentados en la bibliografía cuando se emplean otras técnicas de preconcentración, como pueden ser SPE [446,538], SPME [587] o SBSE [449,450], aunque la mayoría de ellos sólo consideran los PBDEs. Destaca sin embargo la diferencia que existe en los resultados obtenidos con el patrón de mayor concentración, donde los valores de RSD generados para los PBDEs son claramente mejores, con valores inferiores al 9 %, que los obtenidos para los NFRs, donde los niveles quedan comprendidos entre un 8 y un 22 %.

Pese a esta diferencia, la precisión del método puede considerarse aceptable teniendo en cuenta que los trozos de material extractante de PDMS fueron cortados manualmente.

Eficacia de extracción

Al tratarse de una técnica de extracción no cuantitativa se evalúa la eficacia de extracción del método (%) mediante un estudio comparativo entre las áreas obtenidas de los picos de los compuestos extraídos en el GC-MS de una muestra de agua Milli-Q (n=6) con una concentración en muestra de 50 ng L⁻¹ de los analitos frente a un patrón estándar con el mismo nivel de concentración preparado en isooctano. Las extracciones se realizaron bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.6.2, presentadas a modo resumen en la Sección III.3.6.

En la Tabla IV.29 se presentan las eficacias de extracción calculadas para cada uno de los analitos. En ella se pueden ver valores comprendidos entre 9 y 70 %, generando factores de enriquecimiento en el rango desde 108 a 840.

LODs, LOQs y estudio de blancos

Continuando con la validación del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q), se procede a la evaluación de los LODs y LOQs generados tras seleccionar el PDMS como material extractante.

Tras descartar la presencia de alguno de estos analitos en blancos de extracción, estos factores (LODs y LOQs) se evaluaron a partir del punto más bajo del calibrado realizado con muestras de agua Milli-Q (Sección IV.2.6.3) que proporciona la menor señal de respuesta de los analitos, tomando para cada analito en valor de la S/N y calculándolos como 3 veces S/N, para el caso de los LODs, y como 10 veces la relación S/N para estimar los LOQs (método *a*, Sección IV.1). La Tabla IV.29 recoge los LODs y LOQs estimados para cada uno de los analitos. Los LODs obtenidos con el método se consideran satisfactorios para todos los analitos con niveles comprendidos entre 0,4 y 10 ng L⁻¹, comparables y en algunos casos mejores a los encontrados en la bibliografía. Para los PBDEs, se obtuvieron LODs, comprendidos entre 0,4 y 5 ng L⁻¹, similares o incluso mejores de los obtenidos empleando otro tipo de técnicas de extracción como SPME [587], SBSE [449,450], SPE [446,538] o también con PDMS pero empleando GC-ECD como sistema de detección [620]. Por otro lado, no se han realizado hasta la fecha un gran número de investigaciones donde se optimizan métodos para la determinación de los NFRs a partir de matrices acuosas, principalmente se determinan empleando métodos desarrollados para PBDEs. El único método desarrollado hasta la fecha utiliza SPE como técnica de extracción obteniendo LODs similares a los obtenidos en esta investigación [538].

Efectos de matriz y exactitud

La eficacia de extracción de las técnicas de extracción por ad/absorción puede verse afectada por la composición de la matriz de la muestra. Niveles elevados de materia orgánica en disolución o en suspensión pueden competir con el material extractante por los analitos y originar variaciones en la eficacia de extracción en función de la muestra a analizar. Por tanto, se evaluaron los efectos de matriz de la extracción con absorbentes poliméricos para cuatro tipos de aguas con diferente grado de complejidad en su contenido: mar, río, efluente e influente. Estos efectos fueron estimados mediante la comparación de los resultados obtenidos en la extracción de las cuatro muestras anteriores frente a los obtenidos en la extracción de una muestra de agua Milli-Q, todas ellas con adición de 100 ng L⁻¹ de los analitos directamente sobre la muestra previa a la extracción. Se realizan también las mismas extracciones sin adición de los compuestos para los cuatro tipos de aguas, obteniendo así, mediante comparación, las áreas de los picos

correspondientes a la adición de los analitos. Una diferencia significativa entre las áreas obtenidas por las diferentes muestras estudiadas frente a las obtenidas mediante el agua Milli-Q muestra la influencia que ejerce la materia orgánica sobre la extracción de cada analito. El procedimiento de extracción de las muestras se efectuó por triplicado bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.6.2, recogidas de forma resumida en la Figura III.3.6.

Los efectos de matriz de la extracción fueron calculados de acuerdo con la Ecuación 3, determinándose o no la presencia de los mismos en función de su distancia al 100 %, que equivaldría a la extracción de una muestra de agua Milli-Q. Por tanto, desviaciones por encima o por debajo implicarían la presencia de los mismos, siendo más importantes cuanto mayor sea la diferencia.

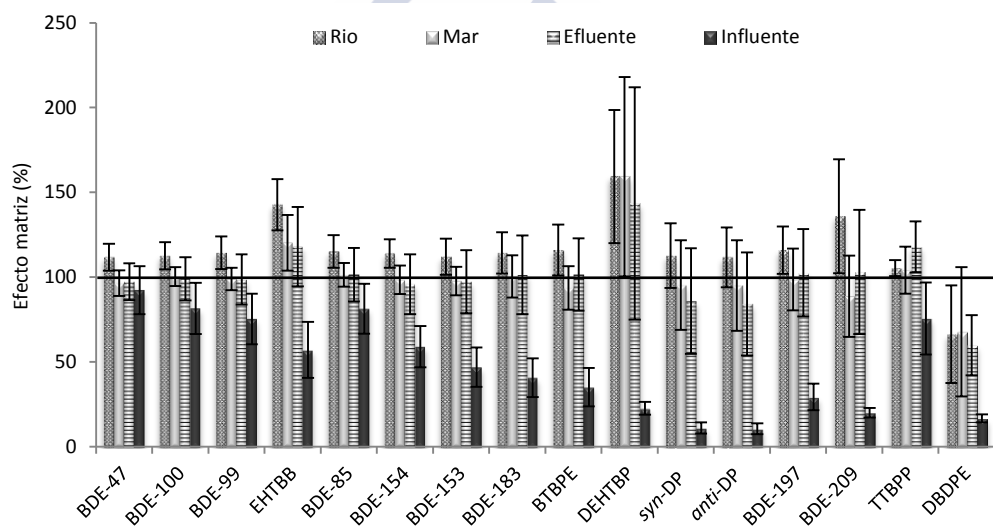


Figura IV.65. Efecto matriz (%) del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs.

La Figura IV.65 recoge los efectos de matriz presentes en estas muestras de aguas analizadas. Como se puede ver, debido a la complejidad de la matriz y por la imposibilidad de realizar una etapa previa de filtración o centrifugación, la muestra de influente es la que proporciona mayores efectos de matriz por disminución de la eficacia de extracción, siendo más importantes para los analitos de mayor tamaño alcanzando reducciones de señal de aproximadamente hasta el 80 %. También se aprecia una disminución de la eficacia de

extracción con cualquier tipo de muestra de agua para el caso del DBDPE. Sin embargo, estas desviaciones se corrigen mediante el uso de los ISs.

Tal y como se puede ver de forma detallada en la Tabla IV.30, se obtuvieron recuperaciones relativas (%) aceptables comprendidas entre 70 y 130 % con todas las matrices de las muestras, excepto para el DBDPE (50 - 70 %). Para finalizar, se presenta en la Figura IV.66 un cromatograma de una muestra de agua de mar con adición de los analitos a 50 ng L⁻¹.

Tabla IV.30. Recuperaciones relativas (%) (RSD) del método de extracción con absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs tras la corrección de la señal con los correspondientes ISs.

COMPUESTO	% RECUPERACIÓN RELATIVA (RSD)			
	RÍO	MAR	EFLUENTE	INFLUENTE
BDE-47	107 (9)	102 (5)	105 (14)	115 (11)
BDE-100	107 (6)	107 (8)	106 (12)	101 (13)
BDE-99	109 (6)	105 (8)	106 (12)	93 (13)
EHTBB	128 (5)	120 (4)	97 (12)	99 (10)
BDE-85	110 (7)	108 (7)	109 (11)	101 (12)
BDE-154	109 (6)	105 (10)	103 (14)	77 (17)
BDE-153	107 (3)	98 (3)	93 (14)	78 (9)
BDE-183	109 (5)	101 (6)	97 (16)	112 (13)
BTBPE	111 (10)	94 (4)	97 (15)	96 (11)
DEHTBP	105 (7)	120 (9)	114 (6)	70 (13)
<i>syn</i> -DP	81 (21)	90 (20)	72 (6)	89 (19)
<i>anti</i> -DP	80 (20)	89 (20)	71 (5)	86 (18)
BDE-197	111 (7)	99 (10)	98 (18)	81 (10)
BDE-209	96 (13)	83 (10)	85 (6)	85 (9)
TTBPP	101 (3)	111 (3)	127 (7)	94 (21)
DBDPE	70 (10)	68 (11)	60 (8)	50 (5)

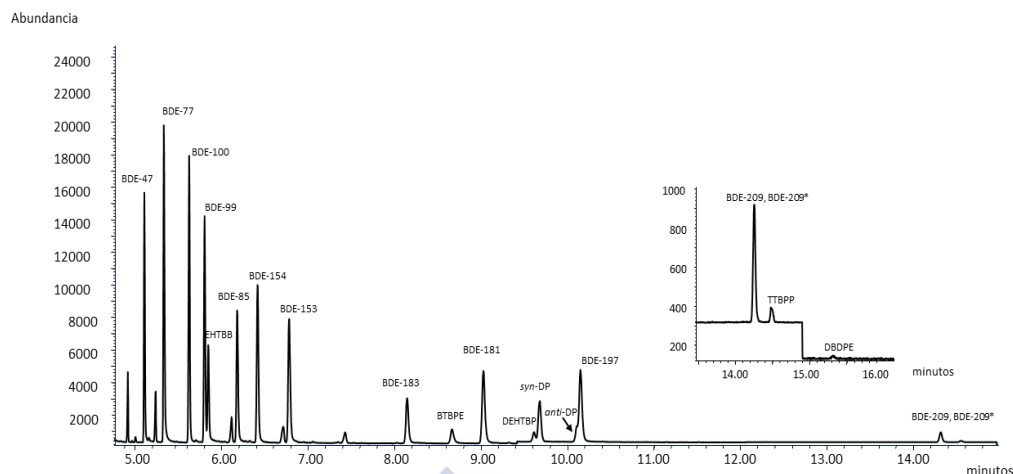


Figura IV.66. Cromatograma de muestra de agua de mar con adición de 50 ng L^{-1} de FRs y 100 ng L^{-1} de ISs mediante la inyección en el GC-(NCl)-MS(Q).

2.6.4 Aplicación a muestras reales

Como último punto en el desarrollo de esta investigación, se decide aplicar el método desarrollado a la determinación de los FRs estudiados en muestras de aguas de diferentes sectores ambientales, entre ellas aguas de mar, río, ría, efluente e influente. Los detalles en cuanto al período de recolección y el tipo de muestras empleadas en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.1.

Para ello, se realizaron extracciones por triplicado para cada una de las muestras bajo las condiciones optimizadas a lo largo de este estudio (Sección IV.2.6.2 o esquema resumen en Sección III.3.6) empleando PDMS como material polimérico extractante, adicionando para la cuantificación 100 ng L^{-1} de ISs sobre la muestra.

A grandes rasgos, según lo que se recoge en la Tabla IV.31 (sólo los analitos detectados en algún caso), apenas se detectaron los analitos de interés en las muestras analizadas. Entre los NFRs sólo dos de ellos son detectados en muestras pero a niveles no cuantificables, el DEHTBP en aguas de influentes y el *syn*-DP en aguas de mar. Entre los PBDEs únicamente se detectó el BDE-197 en las aguas superficiales, aunque al igual que antes, a niveles no cuantificables. Por otro lado, entre las aguas procedentes de las estaciones depuradoras se detectaron PBDEs de menor tamaño como el BDE-47 o BDE-99 (sin cuantificación), y el BDE-197 que alcanzó niveles de 8 ng L^{-1} .

Tabla IV.31. Concentración ($\bar{x} \pm SD$, ng L⁻¹) de FRs en muestras de ría, río, mar, efluente e influente (n=3).

ng L ⁻¹	RÍA	RÍO	MAR	EFLUENTE	INFLUENTE
BDE-47	nd	nd	nd	nd	nc
BDE-99	nd	nd	nd	nd	nc
DEHTBP	nd	nd	nd	nd	nc
syn-DP	nd	nd	nc	nd	nd
BDE-197	nd	nc	nd	nd	8 ± 3

nd: no detectable (<LOD)

nc: no cuantificable (<LOQ)



2.7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS RETARDANTES DE LLAMA EN MOLUSCOS MEDIANTE MSPD

2.7.1 Introducción y objetivos

Con base en el elevado carácter lipofílico característico de estos contaminantes, estos compuestos podrían haber alcanzado, a través de las aguas residuales y por consiguiente también de las superficiales y otras fuentes, diversos organismos marinos con elevado poder de bioacumulación como pueden ser los moluscos. Por tanto, como última investigación de la presente Tesis Doctoral, se decidió desarrollar un método capaz de determinar simultáneamente diversos FRs, clásicos PBDEs y NFRs, en diferentes muestras de moluscos. Para ello, se selecciona MSPD como método de preparación de muestra, tras los buenos resultados obtenidos en estudios anteriores y la posibilidad de efectuar de forma simultánea la extracción de los analitos y etapa de limpieza de la muestra.

La separación y determinación de los analitos se realizó mediante GC-MS(Q), empleando NCI como fuente de ionización. Mediante esta combinación se logra una detección sensible y selectiva con la identificación inequívoca de los diferentes analitos.

Esta investigación tiene como principales objetivos:

- ✓ Optimización de las condiciones de extracción mediante MSPD: selección del disolvente de extracción, elección del adsorbente y dispersante, y optimización de las cantidades necesarias de disolvente, adsorbente y dispersante.
- ✓ Validación del método: determinación de efectos de matriz, exactitud, precisión, LODs y LOQs.
- ✓ Aplicación a muestras reales: mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), berberechos (*Cerastoderma edule*) y almeja japónica (*Ruditapes philippinarum*).

2.7.2 Optimización de la técnica de extracción

Selección del soporte sólido (agente dispersante)

La selección del soporte sólido es un paso fundamental para la optimización de la técnica de MSPD, puesto que es el encargado de realizar la ruptura de la estructura de la matriz de la muestra, facilitando al mismo tiempo la interacción entre el disolvente y la muestra, y la elución de los analitos [684]. Para ello, se seleccionaron diferentes materiales recurridos con frecuencia en otros estudios, entre los que se incluyen materiales que actúan en fase reversa (C_{18}), fase normal (sílice, Florisil y alúmina), modo mixto (PSA) e inerte (tierra de diatomeas).

Las extracciones se realizaron por duplicado, homogeneizando inicialmente en un mortero de vidrio 0,5 g de molusco (adición de 20 ng g^{-1} de los analitos) con 0,5 g de los diferentes soportes sólidos, manteniéndose para estas pruebas una relación muestra/soporte sólido 1:1. A continuación, se introduce en la jeringa dónde tendrá lugar la elución de los analitos una primera frita seguida de 2 g de Florisil activado, empleado como agente adsorbente encargado de la retención de las sustancias lipídicas contenidas en la matriz de la muestra, y por último la mezcla homogeneizada previamente. La elución se llevó a cabo con 30 mL de diclorometano y los extractos se concentraron bajo corriente de nitrógeno hasta aproximadamente 0,5 mL en el Turbo-Vap y hasta llegar a sequedad en el Mini-Vap, realizando todos los lavados intermedios con fracciones limpias de diclorometano. Una vez secos, se determinó gravimétricamente la cantidad de residuo seco (%), principalmente compuesto por ácidos grasos. Por último, los extractos se reconstituyeron con 1 mL de isooctano para su posterior inyección en el equipo GC-(NCI)-MS(Q).

En la Figura IV.67 se muestran las recuperaciones obtenidas para cuatro analitos representativos empleando los diferentes soportes sólidos. No se aprecian diferencias significativas para los PBDEs (mismo comportamiento que el BDE-100) ni para los dos isómeros del DP en cuanto a la selección del agente dispersante. Sin embargo, para algunos de los NFRs, como el DEHTBP y en menor medida para DBDPE, la elección de uno u otro agente dispersante sí resulta ser un factor decisivo. La alúmina resulta ser el material que genera peores resultados ($dr \sim 0,6 \%$), tanto para el DBDPE como para el DEHTBP, con recuperaciones próximas al 60 y al 20 %, respectivamente. La notable diferencia entre los resultados de las recuperaciones obtenidos para el DEHTBP, hace que también se descarten agentes como la tierra de diatomeas ($dr \sim 0,7 \%$), Florisil ($dr \sim 0,5 \%$) o la sílice ($dr \sim 0,6 \%$), apreciando claramente que tanto el C_{18} como el PSA son los agentes que proporcionan mejores resultados. No obstante, para la selección también es necesario tener en cuenta la

cantidad de residuo seco presente en los extractos generados con cada uno de ellos. Pese a obtener buenos resultados de recuperación (> 60 % para todos los analitos), el C₁₈ proporciona una mayor cantidad de residuo seco (~1 %) en comparación con el resto de materiales, quedando por tanto descartado para su uso. El PSA por el contrario además de obtener excelentes recuperaciones superiores al 80 % para todos los compuestos de interés, genera un menor residuo seco (~0,7 %), siendo seleccionado por tanto como agente dispersante óptimo.

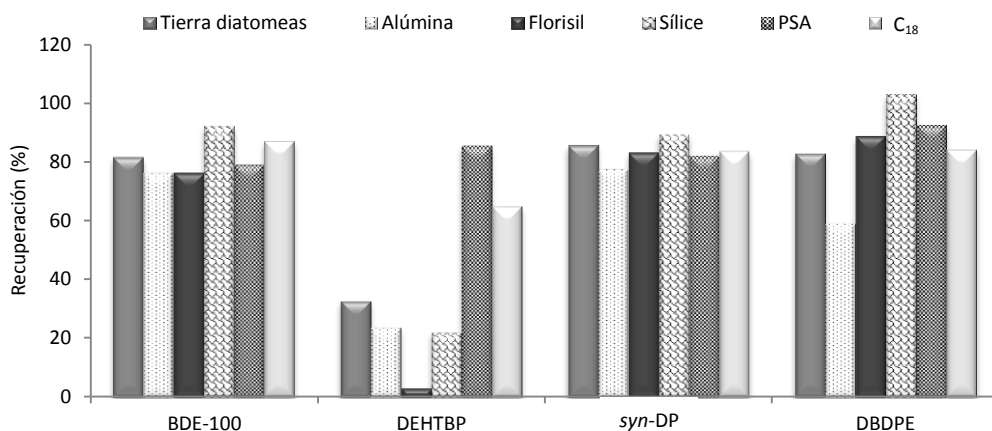


Figura IV.67. Recuperaciones (%) obtenidas con los diferentes soportes sólidos (agentes dispersantes) para cuatro analitos representativos.

Selección de la cantidad de soporte sólido

Otro parámetro importante a tener en cuenta es la relación muestra/soporte sólido. Normalmente, esta relación oscila entre 1:1 y 1:4 [685], aunque puede variar en función del tipo de muestras a emplear. Para ello, se efectuó un estudio por triplicado donde se evalúan las diferentes relaciones con el objetivo de seleccionar aquella que genere mejores resultados en términos de recuperación. Se tomaron 0,5 g de muestra y se dispersaron con las correspondientes cantidades de PSA: 0,5 g (1:1), 1 g (1:2), 1,5 g (1:3) y 2 g (1:4). La mezcla homogeneizada (20 ng g⁻¹ de los analitos) se sitúa en la capa superior, tras situar previamente en la jeringa 2 g de Florisil activado usado como agente adsorbente. Se hacen pasar 30 mL de diclorometano para la elución de los analitos, llevando el extracto a sequedad bajo corriente de N₂ mediante el uso del Turbo-Vap y Mini-Vap, reconstituyéndolos finalmente con 1 mL de isooctano para su inyección en el sistema.

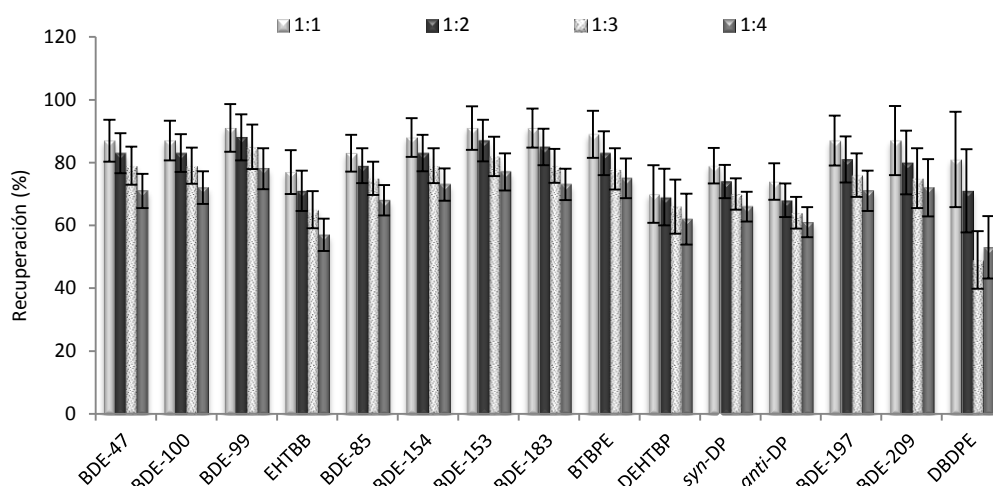


Figura IV.68. Recuperaciones (%) obtenidas para los FRs empleando diferentes relaciones muestra/agente dispersante.

Según los resultados recogidos en la Figura IV.68, se aprecia una ligera reducción de los niveles de la recuperación a medida que aumenta la cantidad del agente dispersante empleado (relaciones elevadas 1:4), siendo más destacable esta reducción para el DBDPE. Por otro lado, no se aprecia variación en la cantidad de residuo seco recogido en los extractos tras modificar la cantidad de soporte sólido. En base a todo lo anterior, se decide establecer una relación 1:1 entre muestra y soporte sólido para realizar el resto del procedimiento.

Selección del adsorbente de limpieza y del disolvente de elución

En esta sección se procede a la evaluación de diversos materiales adsorbentes con características estructurales diferentes y diferentes modos de actuación, un adsorbente en fase reversa (C_{18}), tres adsorbentes en fase normal (Florisil, alúmina y sílice) y ENVI-Carb. Se probó también un método algo más agresivo [488] para obtener extractos libres de materia grasa, empleando para ello sílice impregnada con ácido sulfúrico (40 % w/w). En este último caso, es necesario poner una pequeña cantidad de sílice (0,5 g) en la zona inferior de la jeringa para eliminar la posible presencia de trazas o restos de sulfúrico en los extractos. Las extracciones se realizaron por triplicado con 0,5 g de molusco, 0,5 g de PSA (soporte sólido) y 2 g de los diferentes materiales adsorbentes a evaluar. En este estudio, la muestra homogeneizada con el soporte sólido contiene 20 ng g^{-1} de los analitos de interés. El ácido sulfúrico presente en uno de los adsorbentes estudiados limita en gran medida los posibles

disolventes a utilizar [684], ya que origina la degradación (oxidación) de la mayor parte de ellos. Finalmente, se realiza la elución de los analitos con 30 mL de diclorometano, llevando a sequedad y reconstituyendo el extracto con 1 mL de isooctano.

El porcentaje de grasa en los extractos fue un parámetro excluyente a la hora de realizar la selección. En base al elevado contenido de materia grasa (superior al 1 %) en los extractos, se rechazaron algunos de los adsorbentes previamente seleccionados como ENVI-Carb (dr~3,3 %), alúmina (dr~1,7 %), C₁₈ (dr~1,2 %) y la sílice (dr~2,1 %). Los extractos obtenidos empleando Florisil y sílice (40 % H₂SO₄ (w/w)) fueron bastante más limpios con porcentajes de grasa de aproximadamente 0,6 y 0,2 %, respectivamente.

Una vez realizada una primera selección de los adsorbentes que proporcionan menores porcentajes de grasa en sus extractos, se decide realizar un estudio de los posibles disolventes, puesto que también juegan un papel muy importante, no sólo en la recuperación de los analitos, sino también en el contenido de materia grasa final. Tal y como se mencionó previamente, el ácido sulfúrico presente en el material adsorbente limita el disolvente a emplear puesto que origina la degradación de la mayor parte de ellos, pudiendo sólo ser evaluados el hexano y el diclorometano cuando se emplea sílice (40 % H₂SO₄ (w/w)). Por el contrario, con el Florisil se evaluaron varios disolventes de distinta polaridad, como acetona, hexano, acetato de etilo, acetonitrilo y diclorometano.

Las extracciones para cada una de las combinaciones se desarrollaron por duplicado con 20 ng g⁻¹ de los analitos en la muestra homogeneizada. Se utilizaron 0,5 g de muestra, 0,5 g PSA (agente dispersante), 2 g de adsorbente, realizando las eluciones con tres fracciones de 10 mL de los correspondientes disolventes. Finalmente, los eluatos se llevan a sequedad bajo corriente de N₂ y se reconstituyen en 1 mL de isooctano para su inyección en el sistema.

En la Figura IV.69 se recogen a modo de ejemplo las gráficas de las recuperaciones obtenidas en el estudio de los disolventes y los adsorbentes de limpieza para cuatro FRs. Se muestra el BDE-100 como representación del resto de PBDEs y también de ambos isómeros del DP, mientras que el BTBPE presenta la misma respuesta que el EHTBB. En cuanto a la respuesta en función del tipo de adsorbente, se puede ver por un lado que cuando se emplea Florisil como adsorbente, el hexano (dr~1,4 %) no logra eluir algunos analitos, principalmente los NFRs, ni tan siquiera tras pasar 30 mL (PBDEs y DPs). Similar comportamiento presenta el ACN, con el que se obtienen bajas recuperaciones al intentar eluir el DBDPE. Por otro lado, el DCM (dr~0,6 %), la acetona (dr~2,9 %) y el acetato de etilo (dr~3,8 %) generan buenos resultados para la mayoría de los analitos; sin embargo, en base al contenido de materia grasa (superior al 1 %) en el extracto se descartan estos dos

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

últimos, quedando por lo tanto el DCM como mejor disolvente cuando se emplea Florisil como adsorbente.

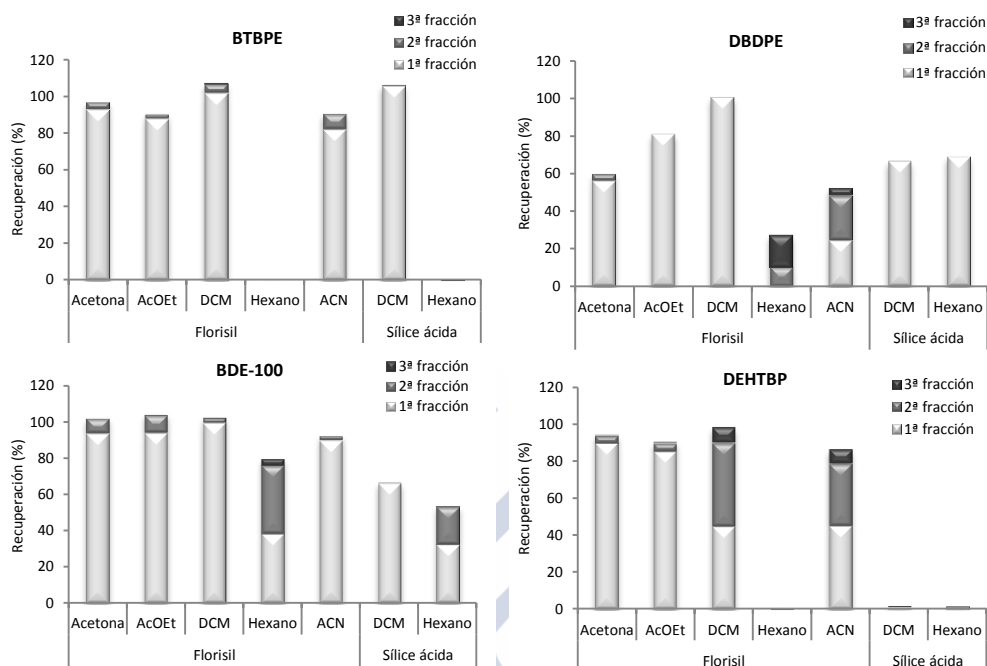


Figura IV.69. Recuperaciones (%) obtenidas para cuatro FRs representativos con los diferentes disolventes empleando Florisil y sílice acidificada como adsorbentes de limpieza.

Estudiando por otro lado los resultados obtenidos empleando la sílice acidificada como adsorbente, se puede ver cómo el DCM es el único que logra extraer los analitos (BTBPE y EHTBB), quedando por tanto considerado para futuros experimentos. Sin embargo, esta combinación probablemente degrada el DEHTBP. En base a lo encontrado en la bibliografía los PBDEs resisten el tratamiento ácido [492,717], pero algunos NFRs han mostrado degradaciones significativas en función del tipo de condiciones o su estabilidad todavía no ha sido estudiada [772]. Por tanto, se realizó un estudio con diferentes porcentajes de ácido sulfúrico en la sílice empleada como adsorbente (0, 10, 20 y 40 % (w/w) para estudiar la estabilidad que presentan todos los analitos frente a diferentes condiciones ácidas. Las extracciones se realizan por triplicado con adición de 20 ng g⁻¹, empleando 0,5 g de muestra y 0,5 g de PSA como agente dispersante, 2 g de adsorbente, situando debajo 0,5 g de sílice para retener trazas de sulfúrico y evitar perjudicar la columna cromatográfica. La elución se realiza con 30 mL de DCM, seguida de una etapa de concentración de los extractos hasta llegar a sequedad y reconstitución con 1 mL de isooctano.

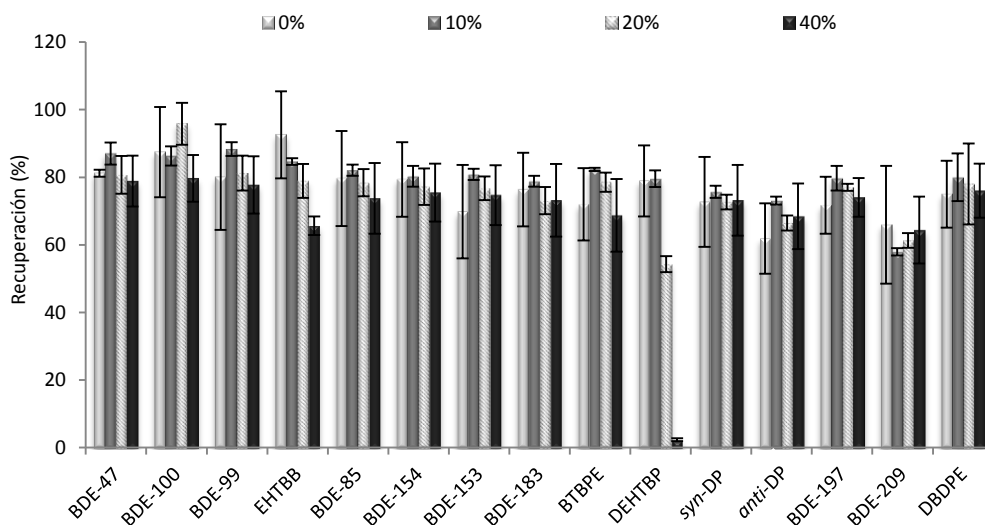


Figura IV.70. Recuperaciones (%) obtenidas usando diferentes porcentajes de H_2SO_4 en la sílice empleada como adsorbente.

La Figura IV.70 recoge el comportamiento, en función de las recuperaciones, de cada uno de los analitos frente al porcentaje de ácido sulfúrico presente en la sílice. Se puede ver cómo la mayor parte de los analitos, incluyendo todos PBDEs, BTBPE, DBDPE y ambos isómeros del DP, permanecen invariantes frente al contenido del ácido, lo que demuestra la gran estabilidad de todos ellos a condiciones ácidas. No obstante, otros analitos como el EHTBB y DEHTBP, muestran una disminución de las recuperaciones con el incremento del contenido ácido del adsorbente, siendo muy notable para el segundo de ellos, donde las recuperaciones disminuyen en torno a un 50 % al 20 % de contenido ácido en el adsorbente y obteniendo recuperaciones de tan sólo un 4 % a los niveles de H_2SO_4 más elevados (40 %). Esto demuestra la inestabilidad de ambos compuestos frente a las condiciones ácidas.

Según lo recogido en la Tabla IV.32, la ausencia de una cierta cantidad de H_2SO_4 en el adsorbente genera extractos con un alto contenido lipídico (superior al 2 %). Combinando los resultados obtenidos tanto de la Figura IV.70 junto con los de la Tabla IV.32 se decide seleccionar un 10 % (w/w) de H_2SO_4 en la sílice tras proporcionar recuperaciones aceptables (entre un 60 y un 85 %) para todos los analitos, inclusive EHTBB y DEHTBP, y niveles de grasa aceptables en los extractos (próximos al 0,5 %).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV.32. Cantidad de residuo seco (%) en los extractos empleando Florisil y sílice con adición controlada de agua Milli-Q y H_2SO_4 , respectivamente.

%	Florisil (Milli-Q)	Sílice (H_2SO_4)
0	0,6	2,1
5	1,5	-
10	1,5	0,5
20	1,3	0,4
40	-	0,2

Por otro lado, se realizan también estudios con el otro adsorbente candidato, el Florisil, sabiendo que puede emplearse tanto de forma activada o desactivándolo con una cantidad controlada de agua para controlar la limpieza y la recuperación de los analitos. Al igual que en el ensayo anterior, las extracciones se realizaron por triplicado con 0,5 g de muestra, 0,5 g de PSA (soporte sólido), 2 g de Florisil con desactivado con diferentes porcentajes de agua (0, 5, 10 y 20 % (w/w)), adicionando sobre la muestra homogeneizada 20 ng g^{-1} de los analitos de interés. La elución se realizó con 30 mL del disolvente seleccionado para este adsorbente (DCM), llevando a continuación los extractos a sequedad bajo corriente de N_2 y reconstituyéndolos con 1 mL de isooctano para su inyección en el equipo.

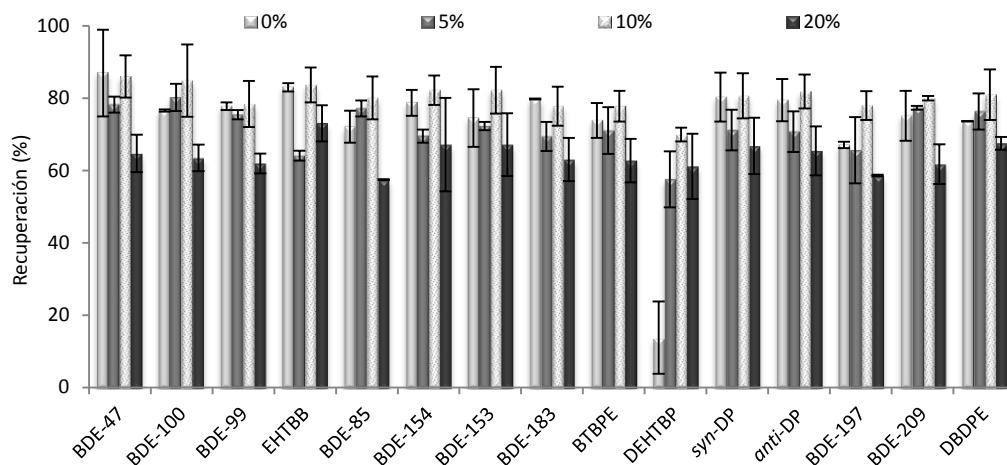


Figura IV.71. Recuperaciones (%) obtenidas usando diferentes porcentajes de agua Milli-Q en el Florisil empleado como adsorbente.

En base a los resultados obtenidos del porcentaje de materia grasa en los extractos (Tabla IV.32), se puede ver cómo los extractos más limpios (dr~0,6 %) se logran al emplear Florisil activado (0 % Milli-Q); sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de las recuperaciones recogidos en la Figura IV.71, esos niveles originan un claro descenso de la recuperación del DEHTBP. Por otro lado, la desactivación del Florisil con agua conlleva un incremento del contenido lipídico en los extractos llegando a alcanzar niveles próximos al 1,5 %, independientemente de la cantidad de agua adicionada. Finalmente, se decide seleccionar por compromiso, entre niveles de recuperación y limpieza de los extractos, un 5 % de agua Milli-Q para la desactivación del Florisil.

Hasta este punto, se seleccionaron la sílice (10 % H_2SO_4 (w/w)) y el Florisil (5 % Milli-Q (w/w)) como mejores candidatos para su uso como adsorbente de la extracción. Sin embargo, tras comprobar que en algunos casos se ha demostrado que la combinación de varios adsorbentes puede llegar a proporcionar mejores resultados [22,773], se decide estudiar la extracción de los analitos empleando ambos adsorbentes de forma individual y combinada, variando la colocación, teniendo por tanto cuatro disposiciones diferentes. Las extracciones se realizaron por duplicado con 0,5 g de muestra y 0,5 g de PSA (soporte sólido) con adición de los analitos sobre la muestra homogeneizada a 20 ng g^{-1} . Para ajustarse al contenido total del cartucho se decidió emplear 3,5 g totales de adsorbente, colocados sobre 0,5 g de sílice (empleada en los cuatro posibles casos), ya sea para los adsorbentes estudiados de forma individual como para los usados en combinación. La elución de los analitos se realiza con 30 mL de DCM, llevando los eluatos a sequedad bajo corriente de N_2 y reconstituyéndolos finalmente en 1 mL de isooctano para su inyección en el equipo.

La selección del adsorbente óptimo se basará tanto en la cantidad de residuo seco presente cada extracto como en las recuperaciones obtenidas con cada adsorbente. Los adsorbentes empleados de forma individual proporcionan resultados de recuperaciones ligeramente superiores a los obtenidos tras la combinación de los mismos, indistintamente de la colocación; sin embargo, generan un mayor contenido en materia grasa, con aproximadamente un 1 % y un 0,8 % para Florisil (5 % Milli-Q) y sílice (10 % H_2SO_4), respectivamente. Por otro lado, pese a que las combinaciones de ambos adsorbentes proporcionan recuperaciones ligeramente inferiores ofrecen mejores resultados de residuo seco con valores por debajo del 0,5 %. Finalmente, se decidió seleccionar la combinación de 1,75 g de Florisil (desactivado con 5 % Milli-Q) sobre una capa de 1,75 g de sílice impregnada con un 10 % de H_2SO_4 , recordando la necesidad de añadir una primera capa de 0,5 g de sílice para eliminar las posibles trazas de sulfúrico en los extractos.

Selección del volumen del disolvente de elución

Como último paso en la optimización de la técnica de extracción se efectuó la selección del volumen de disolvente a utilizar para lograr la elución de los analitos. Se realizaron extracciones por triplicado bajo las condiciones optimizadas a lo largo de las secciones anteriores, 0,5 g de muestra, 0,5 g PSA (soporte sólido), 20 ng g⁻¹ de analitos sobre la mezcla homogénea. Inicialmente se disponen en la jeringa de MSPD, la primera frita, seguida de 0,5 g de sílice, 1,75 g de sílice impregnada con un 10 % de H₂SO₄ y seguido de 1,75 g de Florisil (5 % Milli-Q). La elución se realiza con tres fracciones de 10 mL de DCM llevando los extractos a sequedad bajo corriente de nitrógeno y reconstituyendo en 1 mL de isooctano para su inyección en el GC-NCI-MS.

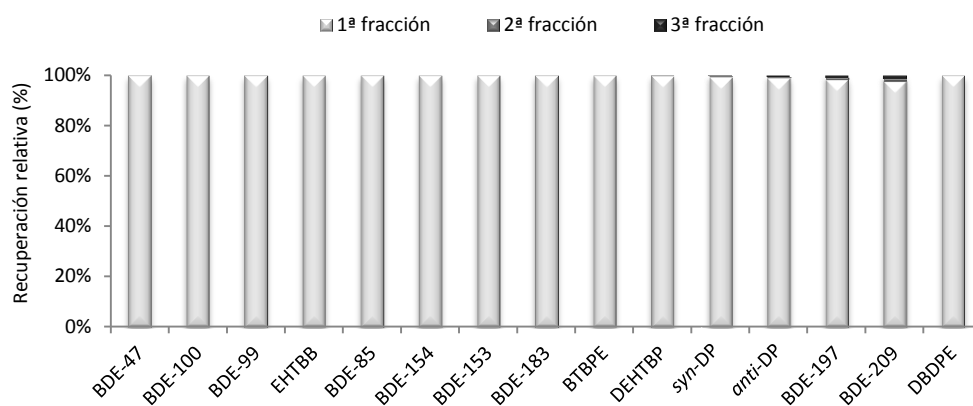


Figura IV.72. Recuperación relativa (%) obtenida para los FRs tras eluir con tres fracciones de 10 mL de DCM.

De acuerdo con lo recogido en la Figura IV.72, se puede ver cómo los analitos son eluidos prácticamente en su totalidad con la primera fracción de disolvente, decidiendo por tanto fijar 10 mL de DCM como disolvente de elución.

2.7.3 Caracterización analítica del método

La validación del método analítico desarrollado se lleva a cabo por medio de la evaluación de los efectos de matriz, estudios de la precisión, exactitud, junto con los valores de los LODs y LOQs obtenidos para cada analito. A lo largo de esta sección se presentará el estudio detallado de cada uno de ellos.

Efectos de matriz

Tras realizar una comparación entre los picos obtenidos para los FRs mediante la inyección de un patrón de concentración conocida frente a los obtenidos a partir de las adiciones sobre extractos de moluscos extraídos mediante el proceso optimizado de MSPD, se aprecia un aumento tanto del área como de la altura de los picos de estos últimos (extractos MSPD). Este tipo de efectos de matriz son poco comunes en GC aunque descritos con relativa frecuencia en la determinación de pesticidas en vegetales mediante GC [774] y también en el análisis de ésteres organofosforados en muestras medioambientales [775]. Estos efectos de matriz originan una mejora de la transferencia de los analitos desde los inyectores de vapor caliente mediante la reducción del estrés térmico de los compuestos lábiles y del enmascaramiento de los sitios activos del puerto de inyección para los analitos lábiles [774]. La cantidad de material lipídico presente en las muestras de moluscos son los principales causantes del enmascaramiento de los puntos activos del inyector, viendo por tanto estos efectos en los extractos y no en los patrones.

Los efectos de matriz en el sistema GC-MS se calcularon de acuerdo con la Ecuación 4, determinándose la presencia o no de los mismos mediante la desviación del 100 %, equivalente a la señal que proporciona un patrón de la misma concentración. Por lo que, efectos de matriz distantes al 100 %, ya sea por reducción o aumento de la señal, implicaría la presencia de los mismos, viéndose incrementados proporcionalmente con la distancia al 100 % [754,755]. Los valores se estimaron mediante un estudio comparativo de la señal de un patrón estándar de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ en isooctano frente a un extracto de mejillón obtenido mediante el protocolo optimizado de MSPD con adición de los analitos tras la extracción al mismo nivel, después de sustraer la señal del extracto sin adición. Los resultados (Figura IV.73) muestran un aumento significativo (tres veces más) de los analitos, principalmente del EHTBB, BTBPE y DBDPE. Desafortunadamente, los tres ISs que se utilizan en este estudio no pueden compensar estos efectos de matriz para los NFRs.

Siguiendo otras opciones descritas en la bibliografía [774], en donde se recomienda el uso de agentes protectores en el patrón para bloquear los puntos activos permitiendo que se genere la totalidad de la señal que pueden proporcionar los analitos, se realizaron ensayos por duplicado probando diferentes protectores con niveles de hasta 1 g L^{-1} de sorbitol y 0,5 % de aceite de oliva, pero sin éxito. En vista de que estos efectos de matriz no logran ser corregidos mediante el uso de agentes protectores, se deciden realizar adiciones estándar sobre los extractos para solucionar estos problemas. Las adiciones estándar se realizan dividiendo los $200 \mu\text{L}$ del extracto en 4 alícuotas al que se le incorporan cantidades cada vez mayores de analitos. No obstante, también se adicionan los ISs surrogados antes de la MSPD para reducir la variabilidad general del método.

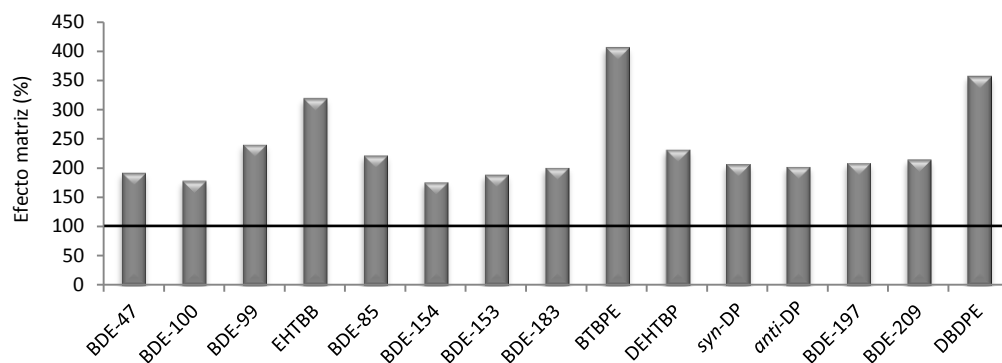


Figura IV.73. Efecto matriz (%) del equipo GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs.

Exactitud y precisión

Los estudios de la exactitud del método se efectúan mediante dos estudios diferentes; por un lado un estudio de la recuperación para las diferentes muestras de moluscos, y por otro, mediante la aplicación del método a la determinación de las cantidades de analitos presentes en dos CRM. El estudio de la precisión se realizó por medio del estudio de la repetibilidad de las muestras, expresada como desviación estándar relativa (RSD, %).

A. Estudio de la recuperación y precisión

Los estudios de las recuperaciones de los analitos se llevaron a cabo bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.7.2 y recogidas de forma resumida en la Sección III.3.7. Para ello, se realizaron extracciones por triplicado para tres tipos de moluscos: mejillón, almeja y berberecho con una adición de los analitos a 20 ng g^{-1} y 80 ng g^{-1} de ISs sobre la muestra homogeneizada. Tras la elución con el disolvente orgánico los eluatos se llevan a sequedad bajo corriente de N_2 y se reconstituyen con $200 \mu\text{L}$ de isooctano. La cuantificación se realiza mediante el método de adición estándar llevado a cabo de la forma que se presenta en el punto anterior.

Según los valores recogidos en la Tabla IV.33, las recuperaciones se encuentran comprendidas entre un rango desde aproximadamente un 70 y un 120 %, a excepción del DEHTBP en almeja, donde la concentración en muestras debe ser corregida con la recuperación. En general, las recuperaciones se consideran bastante satisfactorias,

teniendo en cuenta el amplio número de analitos seleccionados para este estudio y la escasez de métodos analíticos desarrollados para los NFRs.

Los resultados de la precisión expresados como RSD (%) fueron evaluados para los tres tipos de muestras anteriores y se presentan recogidos en la Tabla IV.33. Los valores obtenidos se consideran satisfactorios siendo para los PBDEs inferiores a un 13 %, similares a los obtenidos mediante otras técnicas como ASE [477,491], MAE o Soxhlet [491]; mientras que los NFRs se encuentran comprendidos entre 3 y 23 %.

Tabla IV.33. Recuperaciones (RSD), LODs y LOQs (ng g^{-1}) en dw y ww del método MSPD-GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs en muestras de mejillón, almeja y berberecho.

COMP.	% RECUPERACIÓN RELATIVA (RSD)			LODs (dw)	LODs (ww)	LOQs (dw)	LOQs (ww)
	MEJILLÓN	ALMEJA	BERBERECHO				
BDE-47	113 (13)	109 (7)	100 (4)	0,005	0,001	0,02	0,004
BDE-100	107 (9)	106 (6)	97 (5)	0,004	0,0008	0,01	0,002
BDE-99	104 (7)	104 (3)	95 (4)	0,006	0,0012	0,02	0,004
EHTBB	107 (7)	105 (3)	90 (16)	0,07	0,014	0,2	0,04
BDE-85	99 (8)	101 (4)	94 (6)	0,01	0,002	0,03	0,006
BDE-154	109 (9)	109 (10)	92 (6)	0,01	0,002	0,04	0,008
BDE-153	114 (6)	110 (5)	99 (6)	0,01	0,002	0,03	0,006
BDE-183	112 (6)	107 (5)	93 (7)	0,02	0,004	0,07	0,014
BTBPE	114 (14)	109 (6)	101 (8)	0,03	0,006	0,1	0,02
DEHTBP	102 (11)	46 (2)	70 (23)	0,03	0,006	0,1	0,02
<i>syn</i> -DP	101 (6)	99 (4)	88 (5)	0,003	0,0006	0,01	0,002
<i>anti</i> -DP	110 (8)	108 (4)	96 (7)	0,004	0,0008	0,01	0,002
BDE-197	100 (10)	95 (5)	86 (7)	0,009	0,0018	0,03	0,006
BDE-209	108 (6)	107 (9)	92 (1)	0,07	0,014	0,23	0,046
DBDPE	120 (5)	110 (7)	85 (20)	0,63	0,12	2,11	0,42

A modo ejemplo, se presenta el cromatograma (Figura IV.74) una muestra de berberecho con adición de los analitos a nivel de 20 ng g^{-1} . Fue necesario evaluar la selectividad del método para los tres tipos de moluscos según lo recogido en la normativa

ISO 22032:2009 [680] en cuanto a la aparición de posibles compuestos interferentes. En ella expone la posible coelución de ciertos analitos como el 2,2',4,4',5,5'-hexabromobifenilo (BB-153) y el TBBPA con el BDE-154 y BDE-153, respectivamente, al emplear métodos de GC-(NCI)-MS y columnas capilares no polares. No obstante, no se apreciaron picos coeluidos en ninguna de las matrices estudiadas, pudiendo ser considerados por tanto despreciables.

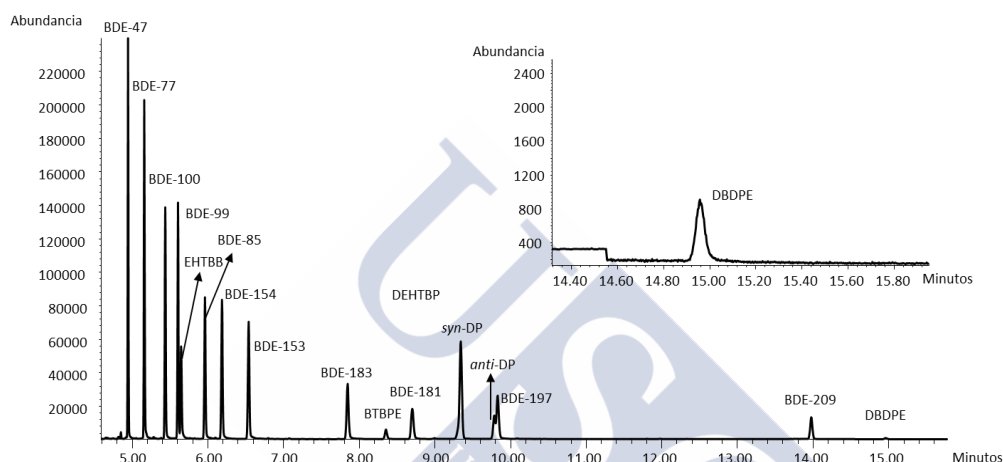


Figura IV.74. Cromatograma muestra berberecho con adición de los FRs a 20 ng g^{-1} .

B. Materiales de referencia certificados (CRMs)

Finalmente, se completó el estudio de la exactitud del método MSPD-GC-(NCI)-MS(Q) mediante el análisis de dos CRMs: tejido de mejillón (SRM 2977) y tejido de salmón (WMF-01). Se realizaron extracciones por triplicado con cada tipo de CRM bajo las condiciones optimizadas a lo largo de la Sección IV.2.7.2 y que se recogen a modo resumen en la Sección III.3.7. Estos dos materiales de referencia sólo certifican la presencia de cinco analitos de los seleccionados en este estudio, como son el BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154 y BDE-183. La Tabla IV.34 muestra una gran similitud entre los niveles certificados y los niveles determinados con el nuevo método (experimentales). Aunque estos CRMs de biota marino están certificados solamente para algunos congéneres de los PBDEs, se han detectado a mayores algunos compuestos no certificados como BDE-209, DP y EHTBB. Por otro lado, serían necesarios nuevos CRMs comerciales o recertificar los CRMs para los NFRs.

Tabla IV.34. Comparación entre concentraciones certificadas y experimentales ($\bar{x} \pm 2 \cdot SD$ ng g⁻¹ ww) de dos CRMs: tejidos de mejillón (SRM 2977) y salmón (WMF-01).

ng g ⁻¹	TEJIDO DE MEJILLÓN (SRM 2977)		TEJIDO DE SALMÓN (WMF-01)	
	CERTIFICADO	EXPERIMENTAL	CERTIFICADO	EXPERIMENTAL
BDE-47	36,5 ± 4,0	37,24 ± 14,33	123,2 ± 24,8	141,9 ± 15,0
BDE-99	4,68 ± 0,92 ^a	4,67 ± 1,84	37,5 ± 4,22	43,6 ± 4,4
BDE-100	1,82 ± 0,64 ^a	1,59 ± 0,42	35,87 ± 14,5	36,9 ± 4,2
BDE-153	0,16 ± 0,04 ^a	0,17 ± 0,03	17,04 ± 8,0	17,0 ± 0,8
BDE-154	0,20 ± 0,09 ^a	0,25 ± 0,05	19,79 ± 2,88	23,9 ± 1,4
BDE-183	-	-	0,532 ± 0,4 ^a	0,72 ± 0,08
BDE-209	-	0,34 ± 0,04	-	0,87 ± 0,06
syn-DP	-	-	-	0,12 ± 0,08
anti-DP	-	0,20 ± 0,08	-	0,39 ± 0,08
EHTBB	-	<LOQ	-	-

^a Valores de referencia

LODs, LOQs y estudios de blancos

Como último punto del proceso de validación del método analítico MSPD-GC-(NCI)-MS(Q) se procede a la determinación de los LODs y LOQs de cada uno de los analitos de interés. Tras comprobar en este caso también la ausencia de blancos de extracción, ambos parámetros se calculan haciendo referencia al molusco liofilizado (dw) obteniendo valores entre 0,003 y 0,07 ng g⁻¹ y entre 0,01 y 0,23 ng g⁻¹, respectivamente, excepto para el DBDPE con valores de 0,6 y 2,1 ng g⁻¹, respectivamente. Se extrapolaron los diferentes valores de los LODs y LOQs para presentarlos también en función del peso húmedo, facilitando así la comparación con el resto de los artículos de la bibliografía, considerando un 80 % de humedad media en las muestras frescas de moluscos, obteniendo finalmente LOQs comprendidos entre 0,002 y 0,42 ng g⁻¹ (Tabla IV.33). Estos niveles son comparables e incluso en algunos casos inferiores a los que se recogen en la bibliografía, pero no sólo para los PBDEs [423,479], también para los NFRs, como el BTBPE, DBDPE y DP [382,425,503,776]. Por otro lado, los LOQs pueden ser considerados aceptables teniendo en cuenta la recomendación Europea, que establece en 0,0085 ng g⁻¹ ww los estándares de calidad medioambiental cuando se emplean muestras de biota marino para el BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 y BDE-154 [266].

2.7.4 Aplicación a muestras reales

Como último punto en esta investigación, se aplica el método desarrollado a la determinación de FRs en mejillones de batea y de roca (*M. galloprovincialis*), una muestra de almeja japónica (*R. philippinarum*) y una muestra de berberecho (*C. edule*). Los detalles en cuanto al período de recolección y al tipo de muestras empleadas en esta investigación se encuentran recogidos en la Sección III.1.5.2.

Las extracciones se realizan por triplicado bajo las condiciones optimizadas previamente en la Sección IV.2.7.2 que se presentan recogidas esquemáticamente en la Sección III.3.7. Como se puede ver en la Tabla IV.35 (concentración en dw) y Tabla IV.36 (concentración en ww), algunos analitos como el BDE-153 y el DBDPE no se detectaron en ninguna de las muestras estudiadas, mientras que el BDE-47 se detecta en todas ellas, alcanzando niveles de hasta $1,4 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ en mejillones de roca. Estos resultados del BDE-47 concuerdan con los niveles detectados en muestras de pescados ($0,002 - 0,05 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$) [503], pero son inferiores a los niveles de PBDEs encontrados en otras muestras de peces que alcanzaron niveles comprendidos entre $0,1$ y $7,1 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$ [479].

Tabla IV.35. Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) de los FRs en muestras reales.

ng g^{-1}	MEJILLÓN BATEA	MEJILLÓN ROCA	ALMEJA	BERBERECHO
BDE-47	$0,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,02$
BDE-100	$0,3 \pm 0,1$	$0,17 \pm 0,01$	nd	nd
BDE-99	$0,25 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,01$	nd	nc
EHTBB	nd	$0,30 \pm 0,05$	nd	nd
BDE-85	$0,10 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,02$	nd	nd
BDE-154	$0,3 \pm 0,1$	nd	nd	nd
BDE-153	nd	nd	nd	nd
BDE-183	nd	$0,65 \pm 0,2$	nd	nd
BTBPE	$0,8 \pm 0,3$	nd	$0,75 \pm 0,05$	nc
DEHTBP	nd	nd	nc	nd
syn-DP	nd	nd	$0,020 \pm 0,005$	nd
anti-DP	nd	nd	$0,19 \pm 0,04$	nd
BDE-197	nd	nd	$0,06 \pm 0,02$	nd
BDE-209	$4,0 \pm 1,5$	nd	$0,25 \pm 0,05$	nd
DBDPE	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable (<LOD)

nc: no cuantificable (<LOQ)

Tabla IV.36. Concentración ($\bar{x} \pm SD$, ng g^{-1} ww) de los FRs en muestras reales.

ng g^{-1}	MEJILLÓN BATEA	MEJILLÓN ROCA	ALMEJA	BERBERECHO
BDE-47	$0,11 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,04$	$0,036 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,004$
BDE-100	$0,06 \pm 0,02$	$0,034 \pm 0,002$	nd	nd
BDE-99	$0,05 \pm 0,01$	$0,078 \pm 0,002$	nd	nc
EHTBB	nd	$0,06 \pm 0,01$	nd	nd
BDE-85	$0,020 \pm 0,008$	$0,048 \pm 0,004$	nd	nd
BDE-154	$0,05 \pm 0,02$	nd	nd	nd
BDE-153	nd	nd	nd	nd
BDE-183	nd	$0,13 \pm 0,04$	nd	nd
BTBPE	$0,16 \pm 0,06$	nd	$0,15 \pm 0,01$	nc
DEHTBP	nd	nd	nc	nd
syn-DP	nd	nd	$0,004 \pm 0,001$	nd
anti-DP	nd	nd	$0,038 \pm 0,008$	nd
BDE-197	nd	nd	$0,012 \pm 0,004$	nd
BDE-209	$0,8 \pm 0,3$	nd	$0,05 \pm 0,01$	nd
DBDPE	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable (<LOD)

nc: no cuantificable (<LOQ)

No obstante, una de las cosas que cabe destacar es la presencia de algunos NFRs, como EHTBB, BTBPE, DEHTBP y DP en algunas de las muestras de moluscos. Los niveles detectados para los dos isómeros del DP son similares o incluso algo menores que los encontrados por Tomy y col. [467], mientras que el resto de los NFRs se encuentran en el rango de concentraciones detectadas por Law y col. [382] en diferentes especies marinas.

Pese a que la Directiva 2013/39/EU [266] establece los límites de calidad para el Σ BDEs (BDE-28, 47, 99, 100, 153 y 154) en $0,0085 \text{ ng g}^{-1}$ ww principalmente en muestras de peces, es importante destacar que todas las muestras analizadas en el presente estudio superan esos niveles, llegando a alcanzar valores de hasta $0,392 \text{ ng g}^{-1}$ ww en muestras de mejillón.





V. CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS



1. CONCLUSIONES

Esta sección presenta las conclusiones más relevantes obtenidas en el desarrollo de siete diferentes metodologías para la determinación de varias familias de contaminantes en el medio marino. Los analitos estudiados incluyen varios contaminantes emergentes, como parabenos, triclosán, PFASs y HFRs. Las diferentes metodologías desarrolladas se aplicaron con muestras relevantes para el medio marino, incluyendo muestras sólidas (moluscos) y matrices acuosas, como aguas superficiales (ríos, rías y mares) y aguas residuales. Los resultados obtenidos proporcionan nuevas herramientas analíticas para estudiar la presencia y distribución de estos contaminantes en el medio marino.

1.1 CONCLUSIONES PARA MUESTRAS ACUOSAS

La presente Tesis Doctoral ofrece un amplio abanico de protocolos para lograr la determinación de las familias de compuestos estudiados a partir de varias matrices acuosas. Para ello, se han evaluado, optimizado y validado cuatro técnicas de extracción diferentes. Cada una de ellas ofrece una serie de ventajas que las convierten en excelentes alternativas frente a las técnicas de extracción más clásicas. A continuación, se recogen las conclusiones detalladas para cada una.

- ✓ La primera metodología desarrollada se basa en una extracción MASE con membranas porosas y acetilación en muestra seguida de un sistema LVI-GC-(ESI)-MS/MS(IT) para lograr la determinación simultánea de siete parabenos y el triclosán en muestras de agua. En términos generales, las técnicas basadas en procedimientos de extracción con membranas ofrecen una reducción significativa del consumo de disolventes, proporcionando extractos más limpios, simplificando su uso en comparación con los métodos clásicos, y particularmente superando muchas de las limitaciones de la LLE. Además, las membranas no porosas, como las empleadas en este estudio, no se consideran únicamente una barrera para las partículas y las especies polares, sino que están consideradas como una parte crucial del procedimiento de extracción generando una selectividad y sensibilidad única de los analitos de interés. En este caso, MASE permitió: (1) no sólo la reducción del consumo de disolvente orgánico (400 µL), sino también de la cantidad de muestra necesaria (18 mL), (2) la exclusión de los componentes de la matriz proporcionando extractos más limpios libres de efectos de matriz durante la extracción de los parabenos, mientras que para el triclosán logran corregirse de manera satisfactoria con los correspondientes patrones internos, y (3) la reducción del coste global del procedimiento. De hecho, el precio de las membranas de

MASE producidas en el laboratorio es de aproximadamente 1 € por 1.000 membranas, por lo que, pueden ser consideradas herramientas realmente económicas, suprimiendo al mismo tiempo el riesgo de problemas de contaminación cruzada.

El método desarrollado resultó ser una gran elección frente a otras técnicas clásicas o de microextracción, como UA-DLLME, USAEME, SPME o SPE, permitiendo la determinación de los analitos por debajo de niveles de nanogramo por litro ($\text{LODs} < 1,4 \text{ ng L}^{-1}$), logrando excelentes recuperaciones de todos los analitos (83 - 101 %), generando respuestas lineales para todos los compuestos y resultados satisfactorios de RSDs ($\text{RSD} < 8,3 \%$). Finalmente, su aplicación sobre muestras reales ha demostrado la amplia distribución de estos compuestos en el medioambiente a través de las aguas residuales, detectando niveles de hasta $26 \mu\text{g L}^{-1}$ de MeP en aguas de influente. La presencia de cada analito y sus correspondientes niveles corroboran la información encontrada en la bibliografía, mostrando que el MeP es el detectado con mayor frecuencia y a mayores niveles, seguido del *n*-PrP y del EtP.

- ✓ La extracción con materiales poliméricos de bajo coste surge como alternativa a las técnicas de microextracción con adsorbentes como consecuencia de las bajas eficacias de extracción (debido a bajo volumen de fase, SPME), la fragilidad de la fibra (SPME) y al elevado precio de los dispositivos comerciales (SBSE y SPME) que conllevan la reutilización y, en algunos casos, el consecuente riesgo de contaminación cruzada. En este estudio, se presenta la extracción con adsorbentes poliméricos seguido de LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) como alternativa a otras técnicas clásicas o de microextracción para lograr la determinación de PFASs en matrices acuosas. En este caso, la técnica de extracción basada en materiales poliméricos permite llevar a cabo la extracción de los analitos de un modo extremadamente simple, mediante el uso de pequeñas cantidades de disolvente ($100 \mu\text{L}$) y material extractante (1 cm de PES) reduciendo el coste global del proceso, permitiendo al igual que MASE, que el material extractante pueda ser desechado tras su uso, suprimiendo de este modo problemas de contaminación cruzada. Además, la extracción de los diferentes analitos con estos materiales poliméricos proporcionan extractos libres de efectos de matriz durante la determinación en el sistema LC-MS/MS con muestras de agua. En este caso, el principal inconveniente es la cantidad de tiempo requerida para completar la etapa de extracción (cerca de 14 horas), sin embargo, la posibilidad de realizar una extracción simultánea de varias muestras junto con el poco tiempo requerido para la desorción de los analitos (sólo 10 min), mitiga este inconveniente. Comparando con el PDMS, el material PES ha resultado ser la mejor opción para lograr la extracción de los PFASs más polares a partir de las muestras acuosas, generando eficacias de extracción satisfactorias (20 - 75 %, excepto

C6 (5 %)), buena repetibilidad ($RSD < 15,3 \%$) y LODs ($LODs < 3 \text{ ng L}^{-1}$ (excepto C6 y C7) comparados con aquellos obtenidos con otros métodos de extracción, como UA-DLLME o SPE.

La aplicación del método desarrollado con muestras reales de agua demuestra, una vez más, la amplia distribución de los PFASs en el medioambiente (Galicia), alcanzando niveles de PFHpA de hasta 401 ng L^{-1} en aguas residuales.

- ✓ A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos con la anterior metodología para la determinación de PFASs en muestras de aguas, la publicación de los niveles de concentración anual media y concentración máxima permitida de PFOS en diferentes tipos de aguas superficiales recogidos en la actual directiva europea de política de aguas (2013/39/EU), implica la necesidad de reducir los LODs del anterior procedimiento desarrollado (3 ng L^{-1} para PFOS) para muestras de agua dulce y principalmente para muestras de agua salada. Se seleccionó la SPE por ser considerada una excelente herramienta para lograr la reducción de los LODs obtenidos tras la extracción con PES, permitiendo de este modo la determinación de los compuestos presentes en la actual directiva.

En primer lugar, se consideraron los protocolos de SPE utilizados normalmente (Oasis® WAX y HLB) para la determinación de PFASs en muestras acuosas, llegando a la conclusión de que los métodos analíticos de SPE desarrollados para agua dulce no pueden aplicarse directamente sobre muestras de agua de mar, necesitando ser cuidadosamente reoptimizados. A diferencia de las muestras de agua dulce para las que se obtenían resultados satisfactorios, los cartuchos Oasis® WAX demuestran una retención incompleta mediante mecanismos de intercambio iónico para las muestras de agua salada.

Finalmente, el protocolo desarrollado de SPE-LC-MS/MS con cartuchos de Oasis® HLB resultó ser una excelente alternativa para lograr la determinación de estos analitos, proporcionando buenas recuperaciones ($> 71 \%$) y bajos LODs ($0,01 - 0,21 \text{ ng L}^{-1}$) permitiendo la detección del PFOS a niveles de concentración tan bajos como los niveles de estándar de calidad medioambiental establecidos por la nueva directiva.

Su aplicación a muestras de aguas de río y mar demuestra que, aunque los niveles de PFOS encontrados no exceden la concentración máxima permitida establecida por la directiva europea 2013/39/EU, sí se encuentran por encima de los estándares de calidad medioambiental de concentración anual media en ríos (aguas continentales), por lo que sería recomendable estudios de monitorización prolongados.

- ✓ Tras los satisfactorios resultados y las numerosas ventajas obtenidas mediante su aplicación con los PFASs, se seleccionó de nuevo la extracción con materiales adsorbentes como técnica de extracción para lograr la determinación de diferentes HFRs en muestras acuosas. La combinación entre la técnica de extracción mediante absorbentes poliméricos y GC-(NCI)-MS(Q) resultó ser un método sencillo, novedoso, efectivo y económico desarrollado como alternativa a las metodologías clásicas para la extracción de HFRs, nueve PBDEs y seis NFRs, a partir de diferentes tipos de muestras acuosas.

Este procedimiento permite llevar a cabo la extracción de los analitos de una forma extremadamente sencilla mediante el uso de pequeños volúmenes de disolvente orgánico (300 μL) y material extractante (en este caso 1 cm de PDMS) reduciendo el coste global del proceso y suprimiendo problemas de contaminación cruzada. Alguno de sus inconvenientes son: (1) la presencia de efectos de matriz durante la extracción como consecuencia de la imposibilidad de realizar etapas de filtrado y centrifugación (pérdida de los analitos mediante estos procedimientos), sin embargo, estos efectos de matriz (principalmente en muestras de influente) se corrigen de manera satisfactoria mediante la adición de los patrones internos, y (2) la cantidad de tiempo necesaria durante la etapa de extracción. No obstante, a diferencia de SPE, este método permite la extracción de muestras no filtradas, suprimiendo de este modo las pérdidas de los analitos.

En este caso se compararon de nuevo las barras de PDMS frente a los tubos de PES, demostrando ser el PDMS el mejor material para estos compuestos lipofílicos (eficacias de extracción: 9 - 70 %) y logrando factores de concentración de hasta 840. La metodología optimizada presenta LODs (0,4 y 10 ng L^{-1}) similares y, en algunos casos, mejores que los encontrados en la bibliografía. Cabe destacar la escasez de métodos capaces de determinar los NFRs en muestras de aguas antes de la realización del presente estudio.

Finalmente, la aplicación de la metodología desarrollada muestra la ausencia (por debajo de LODs) de los contaminantes estudiados en las aguas superficiales (río, ría y mar). En matrices más complejas, como aguas residuales, se detectaron cuatro de los analitos siendo únicamente cuantificable el BDE-197 a niveles de 7,4 ng L^{-1} .

Si comparamos las tres metodologías de extracción evaluadas en la presente memoria, podríamos concluir brevemente que:

- La SPE es necesaria cuando se necesitan alcanzar niveles de ultratrazas, aunque las técnicas de microextracción permiten emplear muestras no filtradas y son técnicas más verdes que la SPE.
- La MASE resulta ser una excelente técnica de microextracción que supera las diferentes limitaciones de la LLE (ej. conlleva un menor consumo de disolventes, fácilmente automatizable y sin formación de emulsiones), siendo más rápida que aquellas que emplean materiales poliméricos.
- El uso de materiales polímeros de bajo coste (como PDMS o PES) como dispositivos de extracción permiten realizar un procedimiento similar a SPME o SBSE, consumiendo de ese modo menos disolvente orgánico que otras, como MASE, y de un modo más sencillo. Sin embargo, es ligeramente más lenta que MASE (o SPE).

1.2 CONCLUSIONES PARA MATRICES DE MOLUSCOS

La presente Tesis Doctoral recoge tres metodologías diferentes para la determinación de parabenos, PFASs y FRs a partir de matrices sólidas. En este caso, las muestras sólidas estudiadas fueron diferentes tipos de moluscos: mejillones, almejas y berberechos.

Se seleccionó para todas ellas la MSPD como técnica de extracción, en base a las diferentes ventajas que ofrece. En comparación con otros procedimientos de extracción para matrices sólidas, la MSPD permite realizar la etapa de limpieza y la elución de los analitos de la matriz de forma simultánea, mediante la disposición de un adsorbente, capaz de retener las sustancias lipídicas, debajo del agente dispersante. Además, el reducido coste global, la simplicidad del procedimiento analítico y los pequeños volúmenes de disolvente y cantidad de muestra necesarios son otras de las ventajas proporcionadas por esta técnica; también en los tres estudios que se recogen a continuación.

- ✓ En el primer caso, la MSPD se aplicó para la extracción de siete parabenos y dos derivados clorados a partir de muestras de moluscos, seguido de un sistema de detección LC-(ESI)-MS/MS(QqQ). Se obtuvieron resultados satisfactorios a partir de los diferentes estudios de validación, logrando LODs ($< 0,43 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) comparables a otros procedimientos de extracción optimizados exclusivamente para los parabenos clásicos, como los QuEChERS seguidos de una etapa de limpieza mediante SPE, PLE o HSSE.

Además, pese a no detectar ninguno de los derivados clorados en las muestras reales, este ha sido el primer estudio que permite la determinación simultánea de los parabenos clásicos y dos derivados clorados en biota, generando buenas recuperaciones (71 - 117 %, excepto Cl₂MeP). A pesar de la ausencia de los derivados clorados, algunos parabenos como MeP, EtP y *n*-PrP fueron detectados y cuantificados alcanzando niveles de hasta 7 ng g⁻¹ dw (MeP) en mejillones.

- ✓ La MSPD ofrece también excelentes resultados para la determinación de PFASs en este tipo de matrices sólidas. En este caso, su combinación con LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) origina LODs similares y, en algunos casos, inferiores (0,3 ng g⁻¹ dw) a otros procedimientos de extracción como FUSLE, digestión alcalina o SLE. Proporciona también recuperaciones satisfactorias y permite la determinación de PFOS a niveles inferiores a los recogidos en la actual directiva de aguas 2013/39/EU para biota. Finalmente, su aplicación a muestras reales pone de manifiesto la amplia distribución medioambiental de estos compuestos a través de un amplio número de fuentes de contaminación, encontrando niveles de hasta 7,3 ng g⁻¹ dw para PFOS y 8,3 ng g⁻¹ dw para PFUnA.
- ✓ En el último estudio, la MSPD acoplada al sistema GC-(NCI)-MS(Q) demuestra su validez para la determinación de nueve PBDEs y seis NFRs a partir de muestras de moluscos, mediante la incorporación de una etapa de limpieza con ácido sulfúrico. El método proporciona excelentes resultados en términos de sensibilidad y selectividad. A pesar de los, poco frecuentes, efectos de matriz encontrados en el inyector del GC (principalmente para el EHTBB, BTBPE y DBDPE), se lograron buenas recuperaciones para todos los analitos (superiores al 70 %, excepto DEHTBP en almeja) tras corregir sus señales con adiciones estándar sobre los extractos. Los LODs son similares, e inferiores en algunos casos, a los recogidos en la bibliografía para 0,5 g de muestra (Soxhlet o PLE), alcanzando valores inferiores a 0,07 ng g⁻¹ dw (excepto DBDPE). Finalmente, se pueden sacar varias conclusiones tras su aplicación a diferentes muestras reales: (1) a pesar de las limitaciones establecidas en la legislación vigente sobre el uso de los PBDEs, todavía se encuentran en el medioambiente a niveles de hasta 4,0 ng g⁻¹ dw (BDE-209) y (2) la amplia distribución medioambiental de algunos HFRs, incluyendo los NFRs.

2. CONCLUSIONS

This section presents the most relevant conclusions obtained from the development of the seven different methodologies in order to determine the presence and distribution of several families of contaminants in the environment. Studied analytes include several emerging contaminants, such as parabens, triclosan, PFASs and HFRs. The developed methodologies were applied to samples relevant for the marine environment, including solid samples (mollusks) and aqueous samples, namely surface water (river, transitional and sea water) and wastewater samples. The obtained results can provide new analytical tools which will be employed to study the presence and fate of these contaminants in the Galician marine environment.

2.1 CONCLUSIONS FOR AQUEOUS MATRICES

This PhD dissertation offers a wide set of analytical protocols to achieve the determination of these compounds for several aqueous samples. Actually, four different extraction techniques were tested, developed and validated. Each one of them offers several advantages which make them excellent alternatives to more classical methodologies. Detailed conclusions from each of these methods are presented below.

- ✓ The first developed methodology is based on in-sample acetylation-non-porous MASE followed by LVI-GC-(ESI)-MS/MS(IT) for the simultaneous determination of seven parabens and triclosan in water samples. In general terms, the techniques based on membrane extraction procedures offer an important solvent consumption reduction, cleaner extracts and simplify their use as compared to classical methods, and particularly overcoming several limitations of LLE. Moreover, non-porous membranes, such as those used in this dissertation, are not only considered a barrier for particles and polar species, they are also considered a crucial part of the extraction procedure providing a unique selectivity and specificity of the interest analytes. Hence, MASE allows: (1) the reduction of the organic solvent required (400 μ L), but also the amount of sample required (18 mL), (2) the exclusion of matrix components resulting in clean extracts without matrix effects during the extraction for parabens, while corrected with correspondent internal standard for triclosan and (3) the reduction of the global cost of the procedure. Actually, the cost of these lab-made LPDE membranes is about 1 € for 1,000 membranes, so, they can be considered as inexpensive disposable devices, eliminating the risk of cross-contamination problems.

The developed method can be a good choice versus other microextraction and classical extraction techniques, such as UA-DLLME, USAEME, SPME or SPE, allowing the determination of analytes at the low nanogram per liter level ($\text{LODs} < 1.4 \text{ ng L}^{-1}$), excellent recoveries of all analytes (83 - 101 %), providing linear responses for all analytes and satisfactory RSDs values ($\text{RSD} < 8.3 \%$). Finally, its application to real samples has demonstrated the wide distribution of these compounds in the environment through wastewater, detecting up to $26 \mu\text{g L}^{-1}$ of MeP in raw wastewater. The presence of each analyte and their correspondent detected levels corroborate the information found in the literature, showing that MeP is the analyte more frequently detected and at higher levels, followed by *n*-PrP and EtP.

- ✓ Low cost sorbent polymeric extraction emerges as an alternative to existing sorbent-based microextraction techniques as a consequence of the low extraction efficiency (due to low phase volume, SPME), fragility of the fiber (SPME) and the elevated price of the commercial devices (SBSE and SPME) which require their reuse and the consequent risk of cross-contamination in some cases. In this study, the developed methodology based on this sorbent extraction protocol followed by LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) is presented as an alternative to other microextraction and classical techniques to achieve the determination of PFASs in aqueous matrices. In this case, the extraction technique based on polymeric sorbents allows to carry on the extraction of analytes in an extremely simple procedure, through the use of small volume of solvent ($100 \mu\text{L}$) and extractant material (1 cm of PES) lowering the overall cost of the process, allowing as MASE, the sorbent material to be discarded after use, thus avoiding cross-contamination problems. Moreover, the extraction of the different analytes with those polymeric materials provides extracts free of matrix effects during the LC-MS/MS determination. In this case, the main drawback is the amount of time required to complete the extraction step (close to 14 hours), however, the possibility of performing a simultaneous extraction of many samples, together with the small amount of time required for the desorption of analytes (only 10 min), mitigate this inconvenient. Compared to PDMS, the PES material has proved to be the best option to achieve the extraction of the most polar PFASs from aqueous samples, providing satisfactory extraction efficiencies (20 - 75 %, except C6 (5%)), good repeatability ($\text{RSD} < 15.3 \%$) and LODs ($\text{LODs} < 3 \text{ ng L}^{-1}$ (except C6 and C7)).
- The application of the developed methodology to real water samples demonstrated, again, the wide distribution of PFASs in the environment (of Galicia), reaching in the case of PFHpA in wastewater up to 401 ng L^{-1} .

- ✓ Despite the satisfactory results obtained with the previous methodology for the determination of PFASs in water samples, the publication of the annual average concentration and the maximum allowable concentration levels of PFOS in several types of surface waters in the recent Water Frame EU Directive (2013/39/EU) implies the need for reduction of the LODs of the previous developed procedure (3 ng L^{-1} for PFOS) for fresh and mainly for marine water samples. SPE was selected as an excellent tool to achieve the LODs required for the determination of such compound.

First, the most frequently applied SPE protocols (Oasis® WAX and HLB) usually performed for the determination of PFASs in aqueous samples were considered and it was concluded that fresh water SPE-based methods cannot be directly applied to sea water samples and needed to be carefully reoptimized. Thus, an incomplete retention by the ion-exchange mechanism of Oasis® WAX, which works with fresh water, occurs in the case of marine samples. Finally, the developed SPE-LC-MS/MS protocol with Oasis® HLB cartridges demonstrated to be an alternative to achieve the determination of these analytes, providing satisfactory recoveries ($> 71 \%$) and lower LODs ($0.01 - 0.21 \text{ ng L}^{-1}$) allowing the detection of PFOS at concentration levels as low as environmental quality standard levels established in the new directive.

The application to river and sea samples shows that, although PFOS levels found in this study do not exceed the maximum allowable concentration recently established by the EU Directive 2013/39/EU, they are above the annual average concentration environmental quality standard levels in river water (inland surface water), so a long-term monitoring would be necessary.

- ✓ Low cost sorbent extraction was also applied to determinate several HFRs in water samples, based on the excellent results and the several advantages obtained with PFASs. The combination between polymeric sorption extraction and GC-(NCI)-MS(Q) results to be an easy, novel, effective and low-cost method, developed as an alternative to the classical methodologies to extract HFRs, nine PBDEs and six NFRs, from different water samples.

This method allows to carry on the extraction of analytes in an extremely simple procedure, through the use of small volume of solvent ($300 \mu\text{L}$) and extractant material (1 cm of PDMS in this case) lowering the overall cost of the process and suppressing cross-contamination problems. Some of the main drawbacks are: (1) the presence of matrix effects during extraction due to the impossibility of perform a centrifugation and filtration step (loss of the analytes in these procedures), however this matrix effect (mainly for influent samples) can be satisfactorily corrected with the addition of internal standards, and (2) the amount of time required for the extraction step. However, in

contrast to SPE, unfiltered samples can be handled with this method, avoiding losses of analytes.

PDMS rods were also compared to PES tubes, being PDMS the best material for these lipophilic compounds (extraction efficiencies: 9 - 70 %) and achieving enrichment factors up to 840. The optimized methodology presents LODs (0.4 y 10 ng L⁻¹) similar and, in some cases, better than those found in the literature. Moreover, there were few methods capable of determining NFRs in water before our work.

Finally, the application of the developed methodology shows the absence (above LODs) of the studied pollutants in surface water (river, ria and sea). In more complex matrices, such as urban wastewater samples four analytes were detected but only BDE-197 could be quantify at 7.4 ng L⁻¹.

If we compare the three extraction methodologies tested here, we could briefly conclude that:

- SPE is necessary when ultratrace LODs need to be achieved, although microextraction techniques can be used with unfiltered samples and are greener than SPE.
- MASE is an excellent microextraction which overcomes LLE limitations (e.g. it consumes lower volumes of solvent, is easily automated and does not suffer from emulsion formation), being faster than the use of bulk sorbent polymers.
- The use of bulk disposable low cost polymers (such as PDMS or PES) can provide a performance similar or better than SPME or SBSE, thus consuming less solvent than e.g. MASE and very easy to perform. However, it is far slower than MASE (or SPE).

2.2 CONCLUSIONS FOR MOLLUSKS SAMPLES

The present PhD dissertation presents three different methodologies for the determination of parabens, PFASs and FRs from solid matrices. In this case, the studied solid samples were different kinds of mollusks: mussels, clams and cockles.

MSPD was selected for all of them as the extraction technique based on the several advantages that it provides. Compared to other solid-matrix extraction procedures, MSPD

permits carrying out the clean-up step at the same time as analytes are eluted from the matrix, placing below the dispersed matrix a sorbent capable of retaining the lipidic substances. Furthermore, low global price, simplicity of the analytical procedure and low volume of solvent and sample amount are some other advantages provided by this technique, also in these three developed studies.

- ✓ In the first case, MSPD was applied for the extraction of seven parabens and two chlorinated derivatives from mollusks samples, followed by a LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) detection system. Satisfactory results were obtained from validation studies, reaching LODs ($< 0.43 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) comparable to other extraction procedures optimized only for classical parabens, such as QuEChERS followed by a SPE clean-up step, PLE or HSSE. Moreover, despite of not detection any chlorinated derivative in real samples, this is the first method which allows the simultaneous determination of classical parabens and two chlorinated derivatives in biota generating satisfactory recoveries (71 - 117 %, except Cl_2MeP). Furthermore, some parabens, such as MeP, EtP and *n*-PrP were detected and quantified, reaching concentration levels up to $7 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (MeP) in mussels.
- ✓ MSPD also offers excellent results for the determination of PFASs in this kind of solid samples. In this case, its combination with LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) generates similar and, in some cases, lower LODs results ($0.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) than other extraction procedures such as FUSLE, alkaline digestion or SLE. Moreover, it offers satisfactory recoveries and allows the determination of PFOS at levels lower than those presented in the Water Frame Directive 2013/39/EU for biota. Finally, its application to real samples demonstrated the wide distribution of these compounds in the environment through a large number of pollution sources, finding PFOS values up to $7.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ and PFUnA up to $8.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$.
- ✓ In the last study, MSPD coupled with GC-(NCI)-MS(Q) demonstrated its suitability for the determination of nine PBDEs and six NFRs from mollusks samples, since it was possible to incorporate a sulfuric acid clean-up for these persistent chemicals. The method offers excellent results in terms of sensibility and selectivity. Despite of the uncommon matrix effects found in the GC injection port (mainly for EHTBB, BTBPE and DBDPE), excellent recoveries (higher than 70 %, except DEHTBP in clam) for all analytes were achieved after standard addition calibration over the extracts. LODs are similar and in some cases lower than those presented in the literature (Soxhlet or PLE) for only 0.5 g of sample, achieving values down to $0.07 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (except DBDPE). Finally, by its application to real samples several conclusions can be taken: (1) in spite of the legislation limiting

PBDEs usage, they could be found in the environment at levels up to $4.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (BDE-209) and (2) the wide distribution of some HFRs, including NFRs, in the environment.





VI. REFERENCIAS / REFERENCES



1. D. Barceló, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 14.
2. M. Terasaki, R. Kamata, F. Shiraishi, M. Makino, Environ. Toxicol. Chem. 28 (2009) 204.
3. K.L. Rule, V.R. Ebbett, P.J. Vikesland, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 3176.
4. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, N. Negreira, R. Cela, Anal. Chim. Acta 575 (2006) 106.
5. M. Terasaki, M. Makino, N. Tatarazako, J. Appl. Toxicol. 29 (2009) 242.
6. K. Ji, Y. Kim, S. Oh, B. Ahn, H. Jo, K. Choi, Environ. Toxicol. Chem. 27 (2008) 2159.
7. Y. Wei, J. Dai, M. Liu, J. Wang, M. Xu, J. Zha, Z. Wang, Environ. Toxicol. Chem. 26 (2007) 2440.
8. L. Wang, H. Sun, L. Yang, C. He, W. Wu, S. Sun, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 436.
9. J.P. Giesy, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 146A.
10. P.L. Andersson, K. Oeberg, U. Oern, Environ. Toxicol. Chem. 25 (2006) 1275.
11. EHC-192. Flame-retardants: a general introduction; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1997.
12. US EPA, 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) Action Plan, https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/pbdes_ap_2009_1230_final.pdf (accessed 17/06/2016).
13. P.O. Darnerud, G.S. Eriksen, T. Johannesson, P.B. Larsen, M. Viluksela, Environ. Health Perspect. 109 (2001) 49.
14. P. Eriksson, E. Jakobsson, A. Fredriksson, Environ. Health Perspect. 109 (2001) 903.
15. J.R. Fowles, A. Fairbrother, L. Baecher-Steppan, N.I. Kerkvliet, Toxicology 86 (1994) 49.
16. P.O. Darnerud, Environ. Int. 29 (2003) 841.
17. P.O. Darnerud, Int. J. Androl. 31 (2008) 152.
18. L.G. Costa, G. Giordano, S. Tagliaferri, A. Caglieri, A. Mutti, Acta Bio Med. Atenei Parmensis 79 (2008) 172.
19. W. Paulus, *Directory of microbicides for the protection on materials - A handbook*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2015.
20. T. Sabalitschka, Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges. 268 (1930) 653.
21. J.K. Lokhnauth, N.H. Snow, Anal. Chem. 77 (2005) 5938.
22. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Anal. Chem. 79 (2007) 1675.
23. C. Liao, L. Chen, K. Kannan, Environ. Int. 57-58 (2013) 68.
24. E.M. Jackson, J. Toxicol., Cutaneous Ocul. Toxicol. 11 (1992) 173.
25. P.A. Berke, D.C. Steinberg, W.E. Rosen, Cosmet. Toiletries 97 (1982) 89.
26. E.E. Boehm, D.N. Maddox, Mfg. Chem. Aerosol News 43 (1972) 21.
27. M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, Food Chem. Toxicol. 43 (2005) 985.
28. A. Pouillot, B. Polla, A. Polla, J. Méd. Esthét. Chir. Dermatol. 33 (2006) 187.
29. M.T. Suller, A.D. Russell, J. Hosp. Infect. 43 (1999) 281.
30. M.T.E. Suller, A.D. Russell, J. Antimicrob. Chemother. 46 (2000) 11.
31. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, J. Chromatogr. A 1188 (2008) 132.
32. Commission Decision 2010/169/EU of 19 March 2010 concerning the non-inclusion of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether in the Union list of additives which may be used in the manufacture of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs under Directive 2002/72/EC, Official Journal of the European Union L75, 23/03/2010, p. 25-26.
33. Interactive PhysProp database demo, available at: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386> (accessed 09/2016)

34. SciFinder Scholar database, available at: <http://www.cas.org/products/sfacad/index.html> (accessed 09/2016)
35. R.L. Elder, J. Am. Coll. Toxicol. 3 (1984) 147.
36. M. Terasaki, M. Makino, Int. J. Environ. Anal. Chem. 88 (2008) 911.
37. I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, Water Res. 45 (2011) 6770.
38. H.N. Bhargava, P.A. Leonard, Am. J. Infect. Control. 24 (1996) 209.
39. H. Sokol, Drug Stand. 20 (1952) 89.
40. G. Clayton, F.E. Clayton, *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, F. John Wiley & Sons Inc, Vol. vol II, part A, 4th ed., New York, United States., 1993.
41. H. Tsukamoto, S. Terada, Chem. Pharm. Bull. 8 (1960) 1066.
42. R. Derache, J. Gourdon, Food Cosmet. Toxicol. 1 (1963) 189.
43. P.S. Jones, D. Thigpen, J.L. Morrison, A.P. Richardson, J. Am. Pharm. Assoc. 45 (1956) 268.
44. A. Dal Pozzo, N. Pastori, Int. J. Cosmet. Sci. 18 (1996) 57.
45. Madsen, T.; 2001. Environmental and health assessment of substances in household detergents and cosmetic detergent products. Environmental Project No. 615. <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-596-9/pdf/87-7944-597-7.pdf> (accessed 07-08-2016).
46. P.D. Darbre, A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, G.S. Pope, J. Appl. Toxicol. 24 (2004) 5.
47. X. Ye, A.M. Bishop, J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, Environ. Health Perspect. 114 (2006) 1843.
48. X. Ye, Z. Kuklenyik, A.M. Bishop, L.L. Needham, A.M. Calafat, J. Chromatogr. B 844 (2006) 53.
49. H.-B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, J. Chromatogr. A 1094 (2005) 122.
50. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 3.
51. M. Lakeram, D.J. Lockley, D.J. Sanders, R. Pendlington, B. Forbes, J. Biomol. Screening 12 (2007) 84.
52. I. Bazin, A. Gadal, E. Touraud, B. Roig, *Hydroxy benzoate preservatives (parabens) in the environment: data for environmental toxicity assessment*, in: *Xenobiotics in the urban water cycle: mass flows, environmental processes, migration and treatment strategies*, chapter 14, D. Fatta-Kassinos, K. Bester, K. Kummerer (Eds.), Springer, Netherlands, 2010, p. 245.
53. H. Yamamoto, I. Tamura, Y. Hirata, J. Kato, K. Kagota, S. Katsuki, A. Yamamoto, Y. Kagami, N. Tatarazako, Sci. Total Environ. 410-411 (2011) 102.
54. L.L. Dobbins, S. Usenko, R.A. Brain, B.W. Brooks, Environ. Toxicol. Chem. 28 (2009) 2744.
55. M. Dymicky, C.N. Huhtanen, Antimicrob. Agents Chemother. 15 (1979) 798.
56. I. Sado, Jpn. J. Hyg. 28 (1973) 463.
57. E.J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, J.P. Sumpter, Toxicol. Appl. Pharmacol. 153 (1998) 12.
58. P.D. Darbre, J.R. Byford, L.E. Shaw, R.A. Horton, G.S. Pope, M.J. Sauer, J. Appl. Toxicol. 22 (2002) 219.
59. P.D. Darbre, J.R. Byford, L.E. Shaw, S. Hall, N.G. Coldham, G.S. Pope, M.J. Sauer, J. Appl. Toxicol. 23 (2003) 43.
60. M. Inui, T. Adachi, S. Takenaka, H. Inui, M. Nakazawa, M. Ueda, H. Watanabe, C. Mori, T. Iguchi, K. Miyatake, Toxicology 194 (2003) 43.

61. P. Bjerregaard, P.R. Hansen, K.J. Larsen, C. Erratico, B. Korsgaard, H. Holbech, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 2387.
62. K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, L.B. Christiansen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard, *Pharmacol. Toxicol.* 86 (2000) 110.
63. S. Oishi, *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1807.
64. European Commision Database, 2006. Priority list of endocrine disruptors, SEC (2007) 1635.
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/index_en.htm#SubThemes5 (accessed 26/08/2016)
65. A.E. Greyshock, P.J. Vikesland, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2615.
66. L. Sánchez-Prado, M. Llompart, M. Lores, M. Fernández-Álvarez, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1548.
67. D.E. Latch, J.L. Packer, W.A. Arnold, K. McNeill, *J. Photochem. Photobiol. A* 158 (2003) 63.
68. M. Mezcua, M.J. Gómez, I. Ferrer, A. Aguera, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 241.
69. M. Lores, M. Llompart, L. Sánchez-Prado, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1294.
70. P. Canosa, S. Morales, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, M. Gómez, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 1119.
71. K. Bester, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49 (2005) 9.
72. A. Lindström, I.J. Buerge, T. Poiger, P.-A. Bergqvist, M.D. Mueller, H.-R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2322.
73. J.G. Black, D. Howes, T. Rutherford, *Toxicology* 3 (1975) 33.
74. A. Kanetoshi, E. Katsura, H. Ogawa, T. Ohyama, K. Kaneshima, T. Kiura, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23 (1992) 91.
75. T. Moss, D. Howes, F.M. Williams, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 361.
76. C. Queckenberg, J. Meins, B. Wachall, O. Doroshenko, D. Tomalik-Scharte, B. Bastian, M. Abdel-Tawab, U. Fuhr, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 570.
77. M.T.M. Tulp, G. Sundstrom, L.B.J.M. Martron, O. Hutzinger, *Xenobiotica* 9 (1979) 65.
78. G. Sandborgh-Englund, M. Adolfsson-Erici, G. Odham, J. Ekstrand, *J. Toxicol. Environ. Health* 69 (2006) 1861.
79. A. Kanetoshi, H. Ogawa, E. Katsura, H. Kaneshima, T. Miura, *J. Chromatogr.* 454 (1988) 145.
80. D.R. Orvos, D.J. Versteeg, J. Inauen, M. Capdevielle, A. Rothenstein, V. Cunningham, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 1338.
81. N. Tatarazako, H. Ishibashi, K. Teshima, K. Kishi, K. Arizono, *Environ. Sci.* 11 (2004) 133.
82. C.M. Foran, E.R. Bennett, W.H. Benson, *Mar. Environ. Res.* 50 (2000) 153.
83. H. Ishibashi, N. Matsumura, M. Hirano, M. Matsuoka, H. Shiratsuchi, Y. Ishibashi, Y. Takao, K. Arizono, *Aquat. Toxicol.* 67 (2004) 167.
84. M. Nassef, S. Matsumoto, M. Seki, F. Khalil, I.J. Kang, Y. Shimasaki, Y. Oshima, T. Honjo, *Chemosphere* 80 (2010) 1095.
85. R. Oliveira, I. Domingues, C. Koppe Grisolia, A.M.V.M. Soares, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (2009) 679.
86. S.A. Raut, R.A. Angus, *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 1287.
87. N. Veldhoen, R.C. Skirrow, H. Osachoff, H. Wigmore, D.J. Clapson, M.P. Gunderson, G. Van Aggelen, C.C. Helbing, *Aquat. Toxicol.* 80 (2006) 217.

88. H.L. Zuckerbraun, H. Babich, R. May, M.C. Sinensky, Eur. J. Oral Sci. 106 (1998) 628.
89. A. Binelli, D. Cogni, M. Parolini, C. Riva, A. Provini, Aquat. Toxicol. 91 (2009) 238.
90. A. Binelli, D. Cogni, M. Parolini, C. Riva, A. Provini, Comp. Biochem. Physiol. 150C (2009) 50.
91. C. Ciniglia, C. Cascone, R. Lo Giudice, G. Pinto, A. Pollio, J. Hazard. Mater. 122 (2005) 227.
92. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Union L396, 30/12/2006, p. 1-849.
93. Council Directive 82/368/EEC of 17 May 1982 amending for the second time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official Journal of the European Communities L167, 15/06/1982, p. 1-32.
94. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) 2010. Opinion on Parabens, SCCS/1348/10. COLIPA n° P82, revision 22 march 2011. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_041.pdf (accessed 09/08/2016).
95. BEK no. 166 af 24/02/2011. Ministry of Environment of Denmark. <https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=135952&exp=1>. (accessed 09/08/2016).
96. Commission Regulation (EU) No 358/2014 of 9 April 2014 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, Official Journal of the European Union L107, 10/04/2014, p. 5-9.
97. Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, Official Journal of the European Union L282, 26/09/2014, p. 5-8.
98. U.S. Food and Drug Administration (2014). Does FDA regulate the use of preservatives in cosmetics?, http://www.fda.gov/Cosmetics/ProductsIngredients/Ingredients/ucm128042.htm#What_are_parabens (accessed 27/07/2016)
99. Health Canada (2014). Safety of Cosmetic Ingredients, <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/labelling-etiquetage/ingredients-eng.php> (accessed 27/07/2016)
100. Council Directive 64/54/EEC of 5 November 1963 on the approximation of the laws of the Member States concerning the preservatives authorised for use in foodstuffs intended for human consumption, Official Journal of the European Communities L161, 27/01/1963, p. 64-68.
101. Directive 95/2/EC. European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners, Official Journal of the European Communities L61, 18/03/1995, p. 1-40.
102. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives, Official Journal of the European Union L354, 31/12/2008, p. 16-33.

103. Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives, Official Journal of the European Union L295, 12/11/2011, p. 1-177.
104. Commission Regulation (EU) No 1130/2011 of 11 November 2011 amending Annex III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council on food additives by establishing a Union list of food additives approved for use in food additives, food enzymes, food flavourings and nutrients, Official Journal of the European Union L295, 12/11/2011, p. 178-204.
105. The EFSA Journal 83 (2004) 1-26.
106. Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs, Official Journal of the European Union L204, 26/07/2006, p. 10-22.
107. U.S. Food and Drug Administration (2012) Title 21: Food and drugs, part 184 - Direct food substances affirmed as generally recognized as safe, Subpart B - Listing of specific substances affirmed as GRAS; Part 184.1670 and 184.1490. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=184> (accessed 23/07/2016)
108. U.S. Food and Drug Administration (2012) Title 21: Food and drugs, part 582 - Substances generally recognized as safe; Part 582.3490 and 582.3670. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=582> (accessed 23/06/2016)
109. M.G. Soni, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, G.A. Burdock, Food Chem. Toxicol. 40 (2002) 1335.
110. Directive 98/8/EC of the European Parliament and Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market, Official Journal of the European Communities L123, 24/04/1998, p. 1-63.
111. Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers (SCCNFP) 2002. Opinion concerning Triclosan, SCCNFP/0600/02. COLIPA n° P32, 21st plenary meeting of 17 September 2002. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sccp/out182_en.pdf (accessed 02/08/2016).
112. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) 2006. Opinion on Triclosan, SCCP/1040/06. COLIPA n° P32, 9th plenary meeting of 10 October 2006. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_073.pdf (accessed 02/08/2016).
113. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) 2011. Opinion on Triclosan, SCCS/1414/11. COLIPA n° P32, addendum to the SCCP Opinion on Triclosan (SCCP/1192/08) from January 2009, 10th plenary meeting of 22 March 2011. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_054.pdf (accessed 02/08/2016)
114. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) 2009. Opinion on Triclosan, SCCP/1192/08. COLIPA n° P32, 19th plenary of 21 January 2009. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_166.pdf (accessed 02/08/2016).
115. Health Canada, 2014. Cosmetic Ingredient Hotlist: Prohibited and restricted ingredients, <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/hot-list-critique/hotlist-liste-eng.php#t1> (accessed 27/07/2016)

116. Commission Directive 2002/72/EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs, Official Journal of the European Communities L220, 15/08/2002, p. 18-58.
117. The EFSA Journal 37 (2004) 1-7.
118. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2009. BfR supports ban on triclosan in food contact materials. BfR Opinion No. 031/2009, 12/June/2009. http://www.bfr.bund.de/cm/349/bfr_supports_ban_on_triclosan_in_food_contact_materials.pdf (accessed 30/10/2016)
119. D. Błedzka, J. Gromadzińska, W. Wasowicz, Environ. Int. 67 (2014) 27.
120. Danish Ministry of the Environment EPA, 2013. Survey of parabens. Environmental Project No. 1474, 2013. <http://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2013/04/978-87-93026-02-5.pdf>. (accessed 07-07-2016).
121. C. Haman, X. Dauchy, C. Rosin, J.-F. Munoz, Water Res. 68 (2015) 1.
122. Danish Ministry of the Environment, EPA 2003. Fate and effects of Triclosan. Project number 861. <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2003/87-7972-984-3/pdf/87-7972-985-1.pdf> (accessed 03/09/2016).
123. K. Bester, Water Res. 37 (2003) 3891.
124. N. Jonkers, H.-P.E. Kohler, A. Dammschaeuser, W. Giger, Environ. Pollut. 157 (2009) 714.
125. N. Ramírez, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Sep. Sci. 35 (2012) 580.
126. K.O. Kusk, T. Kruger, M. Long, C. Taxvig, A.E. Lykkesfeldt, H. Frederiksen, A.-M. Andersson, H.R. Andersen, K.M.S. Hansen, C. Nellemann, E.C. Bonefeld-Joergensen, Environ. Toxicol. Chem. 30 (2010) 413.
127. A. Azzouz, E. Ballesteros, J. Chromatogr. A 1360 (2014) 248.
128. A.M. Casas Ferreira, M. Möder, M.E. Fernández Laespada, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 945.
129. Y. Yu, Q.-X. Huang, Z.-F. Wang, K. Zhang, C.-M. Tang, J.-L. Cui, J.-L. Feng, X.-Z. Peng, J. Environ. Monit. 13 (2011) 871.
130. R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, J.E. Drewes, S.A. Snyder, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 253.
131. E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal. Chim. Acta 647 (2009) 104.
132. D. Bratkowska, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, F. Borrull, N. Fontanals, Anal. Chim. Acta 706 (2011) 135.
133. I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 1756.
134. M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6994.
135. G.A. Loraine, M.E. Pettigrove, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 687.
136. E. Eriksson, H.R. Andersen, T.S. Madsen, A. Ledin, Ecol. Eng. 35 (2009) 661.
137. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1293.
138. K. Yu, B. Li, T. Zhang, Anal. Chim. Acta 738 (2012) 59.
139. H.R. Andersen, M. Lundsbye, H.V. Wedel, E. Eriksson, A. Ledin, Water Sci. Technol. 56 (2007) 45.
140. H. Yamamoto, M. Watanabe, S. Katsuki, Y. Nakamura, S. Moriguchi, Y. Nakamura, J. Sekizawa, Int. J. Environ. Physiol. Toxicol. 14 Suppl (2007) 97.
141. L. Hernández-Leal, N. Vieno, H. Temmink, G. Zeeman, C.J.N. Buisman, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 6835.
142. E. Carmona, V. Andreu, Y. Picó, Sci. Total Environ. 484 (2014) 53.

143. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Water Res.* 43 (2009) 363.
144. X. Peng, Y. Yu, C. Tang, J. Tan, Q. Huang, Z. Wang, *Sci. Total Environ.* 397 (2008) 158.
145. Y. Guo, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 14442.
146. Y. Guo, L. Wang, K. Kannan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66 (2014) 113.
147. B.R. Ramaswamy, G. Shanmugam, G. Velu, B. Rengarajan, D.G.J. Larsson, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1586.
148. E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Electrophoresis* 29 (2008) 3229.
149. N. Jonkers, A. Sousa, S. Galante-Oliveira, C.M. Barroso, H.-P.E. Kohler, W. Giger, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17 (2010) 834.
150. M. Terasaki, Y. Takemura, M. Makino, *Environ. Chem. Lett.* 10 (2012) 401.
151. K.S. Tay, N. Abd. Rahman, M.R. Bin Abas, *Chemosphere* 81 (2010) 1446.
152. E. Gracia-Lor, M. Martínez, J.V. Sancho, G. Penuela, F. Hernández, *Talanta* 99 (2012) 1011.
153. N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 51.
154. J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4693.
155. J. Teerlink, A.S. Hering, C.P. Higgins, J.E. Drewes, *Water Res.* 46 (2012) 3261.
156. L. Renz, C. Volz, D. Michanowicz, K. Ferrar, C. Christian, D. Lenzner, T. El-Hefnawy, *Ecotoxicology* 22 (2013) 632.
157. K. Kimura, Y. Kameda, H. Yamamoto, N. Nakada, I. Tamura, M. Miyazaki, S. Masunaga, *Chemosphere* 107 (2014) 393.
158. C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17.
159. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Water Res.* 42 (2008) 3498.
160. J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J.C. García-Monteagudo, C. García-Jares, *Talanta* 79 (2009) 1387.
161. UNEP 2001. Final act of the conference of plenipotentiaries on the Stockholm Convention on persistent organic pollutants, Annex D, p 41. UNEP/POPS/CONF/4 5 June 2001.
http://www.pops.int/documents/meetings/dipcon/25june2001/conf4_finalact/en/FINALACT-English.PDF (accessed 09/09/2016)
162. A. Jakimska, B. Huerta, Z. Barganska, A. Kot-Wasik, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1306 (2013) 44.
163. J.-W. Kim, B.R. Ramaswamy, K.-H. Chang, T. Isobe, S. Tanabe, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3511.
164. B.R. Ramaswamy, J.-W. Kim, T. Isobe, K.-H. Chang, A. Amano, T.W. Miller, F.P. Siringan, S. Tanabe, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 1739.
165. R. Kanda, P. Griffin, H.A. James, J. Fothergill, *J. Environ. Monit.* 5 (2003) 823.
166. H. Singer, S. Mueller, C. Tixier, L. Pillonel, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4998.
167. D.C. McAvoy, B. Schatowitz, M. Jacob, A. Hauk, W.S. Eckhoff, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 1323.
168. A. Thompson, P. Griffin, R. Stuetz, E. Cartmell, *Water Environ. Res.* 77 (2005) 63.
169. A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, L. Piedra, M. Mézcua, M.J. Gómez, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 193.
170. L. Kantiani, M. Farré, D. Asperger, F. Rubio, S. González, M.J. López de Alda, M. Petrovic, W.L. Shelver, D. Barceló, *J. Hydrol.* 361 (2008) 1.
171. E.L. Waltman, B.J. Venables, W.T. Waller, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 367.

172. P.A. Fair, H.-B. Lee, J. Adams, C. Darling, G. Pacepavicius, M. Alaei, G.D. Bossart, N. Henry, D. Muir, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 2248.
173. D. Sabaliunas, S.F. Webb, A. Hauk, M. Jacob, W.S. Eckhoff, *Water Res.* 37 (2003) 3145.
174. R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 205.
175. K.S. Kumar, S.M. Priya, A.M. Peck, K.S. Sajwan, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (2010) 275.
176. L.B. Barber, J.E. Loyo-Rosales, C.P. Rice, T.A. Minarik, A.K. Oskouie, *Sci. Total Environ.* 517 (2015) 195.
177. Z. Xie, R. Ebinghaus, G. Floeser, A. Caba, W. Ruck, *Environ. Pollut.* 156 (2008) 1190.
178. J.-L. Wu, N.P. Lam, D. Martens, A. Kettrup, Z. Cai, *Talanta* 72 (2007) 1650.
179. R. Loos, J. Wollgast, T. Huber, G. Hanke, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1469.
180. N. Nakada, K. Kiri, H. Shinohara, A. Harada, K. Kuroda, S. Takizawa, H. Takada, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6347.
181. M.G. Pintado-Herrera, E. González-Mazo, P.A. Lara-Martín, *Chemosphere* 95 (2014) 478.
182. R. Rosal, A. Rodríguez, J.A. Perdígón-Melón, A. Petre, E. García-Calvo, M.J. Gómez, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, *Water Res.* 44 (2010) 578.
183. M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2833.
184. R. Rodil, J.B. Quintana, E. Concha-Graña, P. López-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, *Chemosphere* 86 (2012) 1040.
185. J. Heidler, R.U. Halden, *Chemosphere* 66 (2007) 362.
186. M.A. Coogan, T.W. La Point, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1788.
187. S.T. Glassmeyer, E.T. Furlong, D.W. Kolpin, J.D. Cahill, S.D. Zaugg, S.L. Werner, M.T. Meyer, D.D. Kryak, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5157.
188. M.A. Coogan, R.E. Edziyie, T.W. La Point, B.J. Venables, *Chemosphere* 67 (2007) 1911.
189. D.W. Kolpin, M. Skopec, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, *Sci. Total Environ.* 328 (2004) 119.
190. S. Zhang, Q. Zhang, S. Darisaw, O. Ehie, G. Wang, *Chemosphere* 66 (2007) 1057.
191. T. Wind, U. Werner, M. Jacob, A. Hauk, *Chemosphere* 54 (2004) 1135.
192. W.C. Chau, J.-I. Wu, Z. Cai, *Chemosphere* 73 (2008) S13.
193. Y. Takao, M. Shimazu, M. Fukuda, H. Ishibashi, M. Nagae, S. Kohra, Y. Tabira, Y. Ishibashi, K. Arizono, *J. Health Sci.* 54 (2008) 240.
194. N. Nakada, M. Yasojima, Y. Okayasu, K. Komori, Y. Suzuki, *Water Sci. Technol.* 61 (2010) 1739.
195. M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 196.
196. L. Lishman, S.A. Smyth, K. Sarafin, S. Kleywegt, J. Toito, T. Peart, B. Lee, M. Servos, M. Beland, P. Seto, *Sci. Total Environ.* 367 (2006) 544.
197. W. Hua, E.R. Bennett, R.J. Letcher, *Environ. Int.* 31 (2005) 621.
198. M. Adolfsson-Erici, M. Pettersson, J. Parkkonen, J. Sturve, *Chemosphere* 46 (2002) 1485.
199. H. Rüdél, W. Böhmer, M. Müller, A. Fliedner, M. Ricking, D. Teubner, C. Schröter-Kermani, *Chemosphere* 91 (2013) 1517.
200. M.A. Mottaleb, S. Usenko, J.G. O'Donnell, A.J. Ramirez, B.W. Brooks, C.K. Chambliss, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 815.

201. K. Valters, H. Li, M. Alaei, I. D'Sa, G. Marsh, A. Bergman, R.J. Letcher, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5612.
202. E.R. Bennett, P.S. Ross, D. Huff, M. Alaei, R.J. Letcher, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 1078.
203. F.M. Hekster, P. De Voogt, A.M.C.M. Pijnenburg, R.W.P.M. Laane, *Perfluoroalkylated substances: aquatic environmental assessment*, The Hague: Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ, 2002.
204. R.C. Buck, J. Franklin, U. Berger, J.M. Conder, I.T. Cousins, P. de Voogt, A.A. Jensen, K. Kannan, S.A. Mabury, S.P.J. van Leeuwen, *Integr. Environ. Assess. Manage.* 7 (2011) 513.
205. P. de Voogt, M. Saez, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 326.
206. V. Nania, G.E. Pellegrini, L. Fabrizi, G. Sesta, P. De Sanctis, D. Lucchetti, M. Di Pasquale, E. Coni, *Food Chem.* 115 (2009) 951.
207. E. Kissa, *Fluorinated Surfactants and Repellents*, Marcel Dekker, Vol. 1, 2nd Edition, Revised and Expanded, New York, 2001.
208. C. Fei, J.K. McLaughlin, L. Lipworth, J. Olsen, *Hum. Reprod.* 24 (2009) 1200.
209. H.J. Lehmler, *Chemosphere* 58 (2005) 1471.
210. OECD, 2002. Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts, ENV/JM/RD(2002)17/FINAL. <http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/2382880.pdf> (accessed 12/07/2016).
211. US EPA, 2000. Perfluorooctyl sulfonates: proposed significant new use rule, Federal Register 65, No 202, p. 62319.
212. K. Prevedouros, I.T. Cousins, R.C. Buck, S.H. Korzeniowski, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 32.
213. N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, G. Petrick, T. Gamo, *Mar. Pollut. Bull.* 51 (2005) 658.
214. J.P. Giesy, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1339.
215. M. Llorca, M. Farré, Y. Picó, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4840.
216. L. Ahrens, S. Felizeter, R. Ebinghaus, *Chemosphere* 76 (2009) 179.
217. C.-L. Tseng, L.-L. Liu, C.-M. Chen, W.-H. Ding, *J. Chromatogr. A* 1105 (2006) 119.
218. A.M. Calafat, L.L. Needham, Z. Kuklenyik, J.A. Reidy, J.S. Tully, M. Aguilar-Villalobos, L.P. Naeher, *Chemosphere* 63 (2006) 490.
219. I. Vassiliadou, D. Costopoulou, A. Ferderigou, L. Leondiadis, *Chemosphere* 80 (2010) 1199.
220. L. Roosens, W. D'Hollander, L. Bervoets, H. Reynders, K.V. Campenhout, C. Cornelis, R.V.D. Heuvel, G. Koppen, A. Covaci, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2546.
221. S.A. Tittlemier, K. Pepper, C. Seymour, J. Moisey, R. Bronson, X.-L. Cao, R.W. Dabeka, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3203.
222. J.L. Domingo, *Environ. Int.* 40 (2012) 187.
223. I. Ericson, R. Martí-Cid, M. Nadal, B. Van Bavel, G. Lindström, J.L. Domingo, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1787.
224. K.I. Van de Vijver, P.T. Hoff, W. Van Dongen, E.L. Esmans, R. Blust, W.M. De Coen, *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2003) 2037.
225. The EFSA Journal 653 (2008) 1-131.
226. Johnson, J.D., Gibson, S.J. and Ober, R.F. (1979). Absorption of FC-95-14C in rats after a single oral dose. Project No. 890310200, Riker Laboratories, Inc., Subsidiary of 3M, St. Paul, MN. (U.S. EPA Docket No. 8(e)HQ-1180-00374).
227. J.P. Vanden Heuvel, B.I. Kuslikis, M.J. Van Rafelghem, R.E. Peterson, *J. Biochem. Toxicol.* 6 (1991) 83.

228. R.A. Kemper, D.L. Nabb, *Drug Chem. Toxicol.* 28 (2005) 281.
229. Johnson, J.D., Gibson, S.J. and Ober, R.E. (1979). Extent and route of excretion and tissue distribution of total carbon-14 in rats after a single intravenous dose of FC-95-14C. Project No. 8900310200, Riker Laboratories, Inc., Subsidiary of 3M, St. Paul, MN. (U.S. EPA Docket No. 8(e)HQ-1180-00374).
230. A.M. Seacat, P.J. Thomford, K.J. Hansen, G.W. Olsen, M.T. Case, J.L. Butenhoff, *Toxicol. Sci.* 68 (2002) 249.
231. Olsen, G., Ehresman, D., Froehlich, J., Burris, J. and Butenhoff, J. (2005). Evaluation of the half-life ($t_{1/2}$) of elimination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorohexanesulfonate (PFHS) and perfluorooctanoate (PFOA) from human serum. TOX017 Olsen. "Fluoros" 9th International Symposium on Fluorinated Alkyl Organics in the Environment, August 2005, Toronto, Canada.
232. H. Huang, C. Huang, L. Wang, X. Ye, C. Bai, M.T. Simonich, R.L. Tanguay, Q. Dong, *Aquat. Toxicol.* 98 (2010) 139.
233. M.E. Austin, B.S. Kasturi, M. Barber, K. Kannan, P.S. MohanKumar, S.M.J. MohanKumar, *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 1485.
234. Y. Kawashima, H. Kobayashi, H. Miura, H. Kozuka, *Toxicology* 99 (1995) 169.
235. J. Berthiaume, K.B. Wallace, *Toxicol. Lett.* 129 (2002) 23.
236. A.K. Sohlenius, A.M. Eriksson, C. Hoegstroem, M. Kimland, J.W. DePierre, *Pharmacol. Toxicol.* 72 (1993) 90.
237. G.L. Kennedy, Jr., J.L. Butenhoff, G.W. Olsen, J.C. O'Connor, A.M. Seacat, R.G. Perkins, L.B. Biegel, S.R. Murphy, D.G. Farrar, *Crit. Rev. Toxicol.* 34 (2004) 351.
238. Allsopp, M.; Santillo, D.; Walters, A.; Johnston, P.; Perfluorinated chemicals: an emerging concern; Technical note 04//2005, GRL-TN-04-2005, 45 pp.
239. Q. Yang, M. Abedi-Valugerdi, Y. Xie, X.-Y. Zhao, G. Moller, B.D. Nelson, J.W. DePierre, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 389.
240. M.M. Peden-Adams, J.M. Keller, J.G. EuDaly, J. Berger, G.S. Gilkeson, D.E. Keil, *Toxicol. Sci.* 104 (2008) 144.
241. C. Lau, J.L. Butenhoff, J.M. Rogers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198 (2004) 231.
242. C. Lau, J.R. Thibodeaux, R.G. Hanson, J.M. Rogers, B.E. Grey, M.E. Stanton, J.L. Butenhoff, L.A. Stevenson, *Toxicol. Sci.* 74 (2003) 382.
243. B.H. Alexander, G.W. Olsen, J.M. Burris, J.H. Mandel, J.S. Mandel, *Occup. Environ. Med.* 60 (2003) 722.
244. F.D. Gilliland, J.S. Mandel, *J. Occup. Med.* 35 (1993) 950.
245. F.D. Gilliland, J.S. Mandel, *Am. J. Ind. Med.* 29 (1996) 560.
246. G.W. Olsen, J.M. Burris, M.M. Burlew, J.H. Mandel, *Drug Chem. Toxicol.* 23 (2000) 603.
247. G.W. Olsen, F.D. Gilliland, M.M. Burlew, J.M. Burris, J.S. Mandel, J.H. Mandel, *J. Occup. Environ. Med.* 40 (1998) 614.
248. ENDS, 2001. Fluorochemicals: 21st century pollutants, ENDS Report 315, p. 23.
249. US EPA, 2000. EPA internal memorandum, 1-6.
250. UNEP, 2007. Risk management evaluation on perfluorooctane sulfonate , Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC), UNEP/POPS/POPRC.3/20/Add.5.
<http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/ReportsandDecisions/tabid/3309/Default.aspx> (accessed 11/08/2016).
251. UNEP, 2006. Risk profile on perfluorooctane sulfonate , Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC), UNEP/POPS/POPRC.2/17/Add.5.

- <http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Meetings/POPRC2/POPRC2documents/tabid/106/Default.aspx> (accessed 05/08/2016).
252. Environment Agency, 2004. Environmental risk evaluation report: perfluorooctanesulphonate (PFOS), ISBN 978-1-84911-124-9, p. 1-104. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/290857/scho1009brbl-e-e.pdf (accessed 31/08/2016).
 253. US EPA, 2003. Preliminary risk assessment of the developmental toxicity associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts. Office of Pollution Prevention and Toxics Risk Assessment Division, p. 1-63.
 254. Government Canada, 2014. Proposed risk management measure for perfluorooctanoic acid (PFOA) its salts, and its precursors and long-chain (C9-C20) perfluorocarboxylic acids (PFCAs), their salts, and their precursors; Environment and Health Canada. https://www.ec.gc.ca/ese-ees/2A11BA77-C816-4199-8407-0AF38E0E7965/Consultation%20Document_PFOA-PFCA_EN.pdf (accessed 30/08/2016).
 255. DEFRA, 2004. Perfluorooctane sulphonate: risk reduction strategy and analysis of advantages and drawbacks, J454/PFOS RRS. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/183154/pfos-riskstrategy.pdf (accessed 12/07/2016).
 256. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates), Official Journal of the European Union L372, 27/12/2006, p. 32-34.
 257. UNEP, 2009. Listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride, Conference of the Parties (COP), UNEP/POPS/COP.4-SC4/17. <http://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/COP4/COP4Documents/tabid/531/Default.aspx> (accessed 04/08/2016).
 258. ECHA, 2013. Inclusion of Substances of Very High Concern in the Candidate List, ED/69/2013. <http://echa.europa.eu/documents/10162/b54352de-0f2f-454c-bc83-04f191c560b7> (accessed 05/07/2016).
 259. ECHA, 2015. Inclusion of Substances of Very High Concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV, ED/79/2015. <http://echa.europa.eu/documents/10162/895e6c53-79a9-449c-b6d0-3c5f61e38bca> (accessed 07/08/2016).
 260. ECHA, Candidate List of Substances of Very High Concern for authorisation, published in accordance with Article 59 (10) of the REACH Regulation, last update 17/12/2015. <http://echa.europa.eu/web/guest/candidate-list-table> (accessed 07/08/2016).
 261. UNEP, 2015. Proposal to list pentadecafluorooctanoic acid (CAS No: 335-67-1, PFOA, perfluorooctanoic acid), its salts and PFOA-related compounds in Annexes A, B and/or C to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC), UNEP/POPS/POPRC.11/5. <http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Meetings/POPRC11/Overview/tabid/4558/mctl/ViewDetails/EventModID/871/EventID/553/xmid/13837/Default.aspx> (accessed 11/08/2016).

262. Council Decision (EU) 2015/633 of 20 April 2015 on the submission, on behalf of the European Union, of a proposal for the listing of additional chemicals in Annex A to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Official Journal of the European Union L104, 23/04/2015, p. 14-15.
263. Stockholm Convention, 2016. The new POPs under the Stockholm Convention. <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx> (accessed 05/09/2016).
264. The EFSA Journal 248 (2005) 1-16.
265. COT Statment, 2006. COT statement on the tolerable daily intake for perfluorooctane sulfonate, Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, 2006/10. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cotstatementpfoa200610.pdf> (accessed 07/07/2016).
266. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, Official Journal of the European Union L226/1, 24/08/2013, p. 1-17.
267. US EPA, 2015. Long-chain perfluoroalkyl carboxylate and perfluoroalkyl sulfonate chemical substances: significant new use rule, Federal Register 80, No 13, p. 2885-2898.
268. US EPA, 2002. Perfluoroalkyl sulfonates: significant new use rule, Federal Register 67, No 236, p. 72854-72867.
269. Canada Gazette, 2008. Perfluorooctane sulfonate and its salts and certain other compounds regulations, SOR/2008-178, Part II, Vol. 142, No. 12, p. 1305-1387. <http://publications.gc.ca/gazette/archives/p2/2008/2008-06-11/pdf/g2-14212.pdf> (accessed 08/08/2016).
270. CEPA, 1999. Canadian Environmental Protection Act. Department of Justice, Canada. http://www.oas.org/dsd/fida/laws/legislation/canada/canada_epa-1999.pdf (accessed 08/07/2016).
271. Canada Gazette, 2015. Regulations amending the prohibition of certain toxic substances regulations, Part I, Vol. 149, No. 14, p. 748-773.
272. C.R. Powley, S.W. George, M.H. Russell, R.A. Hoke, R.C. Buck, Chemosphere 70 (2008) 664.
273. G.T. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, P.A. Helm, G.A. Stern, K. Friesen, K. Pepper, S.A. Tittlemier, A.T. Fisk, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 6475.
274. L. Ahrens, J.L. Barber, Z. Xie, R. Ebinghaus, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 3122.
275. G.T. Tomy, S.A. Tittlemier, V.P. Palace, W.R. Budakowski, E. Braekevelt, L. Brinkworth, K. Friesen, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 758.
276. F.M. Hekster, R.W.P.M. Laane, P. de Voogt, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 179 (2003) 99.
277. D.A. Ellis, J.W. Martin, S.A.O. De, S.A. Mabury, M.D. Hurley, A.M.P. Sulbaek, T.J. Wallington, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 3316.
278. M.J.A. Dinglasan, Y. Ye, E.A. Edwards, S.A. Mabury, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 2857.
279. P. Hrádková, J. Poustka, V. Hlousková, J. Pulkrabová, M. Tomaniová, J. Hajslová, Czech J. Food Sci. 28 (2010) 333.
280. V.I. Furdui, P.W. Crozier, E.J. Reiner, S.A. Mabury, Chemosphere 73 (2008) S24.
281. F. Orata, N. Quinete, F. Werres, R.-D. Wilken, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 82 (2009) 218.

282. Y.H. Jin, W. Liu, I. Sato, S.F. Nakayama, K. Sasaki, N. Saito, S. Tsuda, *Chemosphere* 77 (2009) 605.
283. J. Sánchez-Ávila, J. Meyer, S. Lacorte, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2833.
284. J. Martín, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Talanta* 143 (2015) 335.
285. D. Skutlarek, M. Exner, H. Faerber, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13 (2006) 299.
286. P. Labadie, M. Chevreuil, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 391.
287. A. Möller, L. Ahrens, R. Surm, J. Westerveld, F. van der Wielen, R. Ebinghaus, P. de Voogt, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3243.
288. K. Wille, J.V. Bussche, H. Noppe, E.D. Wulf, P.V. Caeter, C.R. Janssen, H.F.D. Brabander, L. Vanhaecke, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6616.
289. M.K. So, S. Taniyasu, N. Yamashita, J.P. Giesy, J. Zheng, Z. Fang, S.H. Im, P.K.S. Lam, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4056.
290. J.E. Naile, J.S. Khim, T. Wang, C. Chen, W. Luo, B.-O. Kwon, J. Park, C.-H. Koh, P.D. Jones, Y. Lu, J.P. Giesy, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1237.
291. C. Gómez, J. Vicente, B. Echevarri-Erasun, C. Porte, S. Lacorte, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 948.
292. M.J. Dinglasan-Panlilio, S.S. Prakash, J.E. Baker, *Mar. Pollut. Bull.* 78 (2014) 173.
293. X. Ju, Y. Jin, K. Sasaki, N. Saito, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3538.
294. S. Wei, L.Q. Chen, S. Taniyasu, M.K. So, M.B. Murphy, N. Yamashita, L.W.Y. Yeung, P.K.S. Lam, *Mar. Pollut. Bull.* 54 (2007) 1813.
295. W.-L. Liu, Y.-C. Ko, B.-H. Hwang, Z.-G. Li, T.C.-C. Yang, M.-R. Lee, *Anal. Chim. Acta* 726 (2012) 28.
296. N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, T. Okazawa, G. Petrick, T. Gamo, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5522.
297. L.W.Y. Yeung, N. Yamashita, S. Taniyasu, P.K.S. Lam, R.K. Sinha, D.V. Borole, K. Kannan, *Chemosphere* 76 (2009) 55.
298. E. Zafeiraki, D. Costopoulou, I. Vassiliadou, L. Leondiadis, E. Dassenakis, W. Traag, R.L.A.P. Hoogenboom, S.P.J. van Leeuwen, *Food Add. Contam.* 32 (2015) 2048.
299. J. Thompson, G. Eaglesham, J. Mueller, *Chemosphere* 83 (2011) 1320.
300. A. Dreyer, V. Matthias, I. Weinberg, R. Ebinghaus, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1221.
301. B.F. Scott, C. Spencer, S.A. Mabury, D.C.G. Muir, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7167.
302. Y. Zushi, S. Masunaga, *Chemosphere* 76 (2009) 833.
303. M.M. Schultz, D.F. Barofsky, J.A. Field, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1828.
304. R. Guo, W.-J. Sim, E.-S. Lee, J.-H. Lee, J.-E. Oh, *Water Res.* 44 (2010) 3476.
305. C. Kunacheva, S. Tanaka, S. Fujii, S.K. Boontanon, C. Musirat, T. Wongwattana, B.R. Shivakoti, *Chemosphere* 83 (2011) 737.
306. R. Loos, G. Locoro, T. Huber, J. Wollgast, E.H. Christoph, A.d. Jager, B.M. Gawlik, G. Hanke, G. Umlauf, J.-M. Zaldívar, *Chemosphere* 71 (2008) 306.
307. V. Dufková, R. Cabala, V. Sevcík, *Chemosphere* 87 (2012) 463.
308. Y. Zhang, S. Lai, Z. Zhao, F. Liu, H. Chen, S. Zou, Z. Xie, R. Ebinghaus, *Chemosphere* 93 (2013) 1519.
309. M. Murakami, E. Imamura, H. Shinohara, K. Kiri, Y. Muramatsu, A. Harada, H. Takada, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6566.
310. N.P.H. Lein, S. Fujii, S. Tanaka, M. Nozoe, H. Tanaka, *Desalination* 226 (2008) 338.
311. N. Yamashita, S. Taniyasu, G. Petrick, S. Wei, T. Gamo, P.K.S. Lam, K. Kannan, *Chemosphere* 70 (2008) 1247.
312. R. Alzaga, J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 155.
313. A.M. Becker, S. Gerstmann, H. Frank, *Chemosphere* 72 (2008) 115.

314. A.M. Weremiuk, S. Gerstmann, H. Frank, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2251.
315. N. Theobald, C. Caliebe, W. Gerwinski, H. Huehnerfuss, P. Lepom, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18 (2011) 1057.
316. F. Gosetti, U. Chiuminatto, D. Zampieri, E. Mazzucco, E. Robotti, G. Calabrese, M.C. Gennaro, E. Marengo, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7864.
317. C.A. Huset, A.C. Chiaia, D.F. Barofsky, N. Jonkers, H.-P.E. Kohler, C. Ort, W. Giger, J.A. Field, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6369.
318. C. Dong, Z. Wang, C. Han, L. Cui, M. Hu, J. Wu, Y. Liu, Y. Cai, H. Wang, Y. Kang, *Talanta* 85 (2011) 345.
319. F. Li, H. Sun, Z. Hao, N. He, L. Zhao, T. Zhang, T. Sun, *Chemosphere* 84 (2011) 265.
320. M.K. So, Y. Miyake, W.Y. Yeung, Y.M. Ho, S. Taniyasu, P. Rostkowski, N. Yamashita, B.S. Zhou, X.J. Shi, J.X. Wang, J.P. Giesy, H. Yu, P.K.S. Lam, *Chemosphere* 68 (2007) 2085.
321. L. Yang, L. Zhu, Z. Liu, *Chemosphere* 83 (2011) 806.
322. G. Pan, C. You, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1363.
323. X. Han, T.A. Snow, R.A. Kemper, G.W. Jepson, *Chem. Res. Toxicol.* 16 (2003) 775.
324. X. Li, L.W.Y. Yeung, S. Taniyasu, P.K.S. Lam, N. Yamashita, M. Xu, J. Dai, *Chemosphere* 73 (2008) 1649.
325. K. Kannan, J. Koistinen, K. Beckmen, T. Evans, J.F. Gorzelany, K.J. Hansen, O.P.D. Jones, E. Helle, M. Nyman, J.P. Giesy, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1593.
326. U. Berger, A. Glynn, K.E. Holmström, M. Berglund, E.H. Ankarberg, A. Törnkvist, *Chemosphere* 76 (2009) 799.
327. V. Ciccotelli, M.C. Abete, S. Squadrone, *Food Control* 59 (2016) 46.
328. S. Squadrone, V. Ciccotelli, M. Prearo, L. Favaro, T. Scanzio, C. Foglini, M.C. Abete, *Environ. Monit. Assess.* 187 (2015) 1.
329. U. Berger, M. Haukas, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 210.
330. N. Quinete, Q. Wu, T. Zhang, S.H. Yun, I. Moreira, K. Kannan, *Chemosphere* 77 (2009) 863.
331. M. Llorca, M. Farré, Y. Picó, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1145.
332. M. Fernández-Sanjuan, J. Meyer, J. Damásio, M. Faria, C. Barata, S. Lacorte, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1447.
333. K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, J.P. Giesy, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3210.
334. M. Haukas, U. Berger, H. Hop, B. Gulliksen, G.W. Gabrielsen, *Environ. Pollut.* 148 (2007) 360.
335. R. Vestergren, S. Ullah, I.T. Cousins, U. Berger, *J. Chromatogr. A* 1237 (2012) 64.
336. N.G. Dodder, K.A. Maruya, P. Lee Ferguson, R. Grace, S. Klosterhaus, M.J. La Guardia, G.G. Lauenstein, J. Ramirez, *Mar. Pollut. Bull.* 81 (2014) 340.
337. K. Kannan, K.J. Hansen, T.L. Wade, J.P. Giesy, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42 (2002) 313.
338. K. Kannan, L. Tao, E. Sinclair, S.D. Pastva, D.J. Jude, J.P. Giesy, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48 (2005) 559.
339. K.S. Kumar, Y. Zushi, S. Masunaga, M. Gilligan, C. Pride, K.S. Sajwan, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 601.
340. Y. Pan, Y. Shi, Y. Wang, Y. Cai, G. Jiang, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 508.
341. M.K. So, S. Taniyasu, P.K.S. Lam, G.J. Zheng, J.P. Giesy, N. Yamashita, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50 (2006) 240.
342. A. Gulkowska, Q. Jiang, M.K. So, S. Taniyasu, P.K.S. Lam, N. Yamashita, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3736.

343. A.D. Delinsky, M.J. Strynar, S.F. Nakayama, J.L. Varns, X. Ye, P.J. McCann, A.B. Lindstrom, *Environ. Res.* 109 (2009) 975.
344. M. Harju, E.S. Heimstad, D. Herzke, T. Sandanger, S. Posner, F. Wania, Current state of knowledge and monitoring requirements - Emerging "new" brominated flame retardants in flame retarded products and the environment (TA-2462/2008), Norwegian Pollution Control Authority, Oslo 2008.
345. T. Mørskeland, Environmental screening of selected "new" brominated flame retardants and selected polyfluorinated compounds 2009 (TA-2625/2010), Norwegian Climate and Pollution Agency, Høvic 2010.
346. M. Alaee, P. Arias, A. Sjödin, Å. Bergman, *Environ. Int.* 29 (2003) 683.
347. L.S. Birnbaum, D.F. Staskal, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 9.
348. U. Fink, F. Hajduk, Y. Ishikawa, Flame Retardants, SRI Consulting, 2005.
349. S. Tanabe, K. Ramu, T. Isobe, S. Takahashi, *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 188.
350. Meeting of the California Environmental Contaminant Biomonitoring Program (CECBP) (2008). Brominated and chlorinated organic chemical compounds used as flame retardant. Scientific Guidance Panel (SGP). Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA).
351. C.A. de Wit, D. Herzke, K. Vorkamp, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 2885.
352. A. Covaci, S. Harrad, M.A.E. Abdallah, N. Ali, R.J. Law, D. Herzke, C.A. de Wit, *Environ. Int.* 37 (2011) 532.
353. Health & Safety Executive, 2012. Proposal for identification of a PBT/vPvB substance; Redgrave Court; United Kindom, http://echa.europa.eu/documents/10162/13638/SVHC_AXVREP_pub_EC_214_604_9_decabromodiphenylether_en.pdf (accessed 16/06/2016).
354. Meeting of the California Environmental Biomonitoring Program (CECBP) 2008. Brominated and chlorinated organic chemical compounds used as flame retardants; Scientific Guidance Panel (SGP), <http://biomonitoring.ca.gov/sites/default/files/downloads/120408flamedoc.pdf> (accessed 16/09/2016).
355. US EPA, 2002. Non-confidential Inventory Update Reporting Production Volume Information. Toxic Substances Control Act (TSCA) Inventory. <http://www.epa.gov/oppt/iur/tools/data/2002-vol.html> (accessed 16/06/2016).
356. E. Hoh, L. Zhu, R.A. Hites, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 2472.
357. J. Verreault, W.A. Gebbink, L.T. Gauthier, G.W. Gabrielsen, R.J. Letcher, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4925.
358. UNEP, 1997. Flame retardants: a general introduction, 192; Environment Health Criteria (EHC), <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc192.html> (accessed 16/06/2016).
359. DSGB, 2002. FR-370: Tris(3-bromo-2,2(bromomethyl)propyl)phosphate, CAS 19186-97-1; Bromine Compounds LTD., Health, Safety and Environment, <http://icl-ip.com/wp-content/uploads/2012/03/FR-370-fact-sheet-.pdf> (accessed 17/06/2016)
360. K.L.E. Kaiser, *Environ. Sci. Technol.* 12 (1978) 520.
361. E. Hoh, L. Zhu, R.A. Hites, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1184.
362. G.T. Tomy, C.R. Thomas, T.M. Zidane, K.E. Murison, K. Pleskach, J. Hare, G. Arsenault, C.H. Marvin, E. Sverko, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5562.
363. J. Zhu, Y.-I. Feng, M. Shoeib, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 7694.
364. US EPA, 2010. Toxic Substances Control Act (TSCA). <http://www.epa.gov/oppt/iur/tools/data/2002-vol.html> (accessed 21/10/2016).

365. D.-G. Wang, M. Yang, H. Qi, E. Sverko, W.-L. Ma, Y.-F. Li, M. Alaei, E.J. Reiner, L. Shen, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 6608.
366. Occidental Chemical Corporation (OxyChem), Dechlorane Plus Manual, http://www.oxy.com/OurBusinesses/Chemicals/Products/Documents/dechlorane_plus/dechlorane_plus.pdf (accessed 04/08/2016).
367. K. Kakimoto, H. Nagayoshi, J. Yoshida, K. Akutsu, Y. Konishi, A. Toriba, K. Hayakawa, *Chemosphere* 89 (2012) 416.
368. The European Commission EUR 22693 report on potential alternatives to deca-BDE used in polymeric applications in electrical and electronic equipment, and assessment of the availability of potential alternatives to DECABDE, January 2007, <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/11111111/5259/1/EUR%2022693.pdf> (accessed 28/08/2016).
369. S. Pakalin, T. Cole, J. Steinkellner, R. Nicolas, C. Tissier, S. Munn, S. Eisenreich, Review on production processes of decabromodiphenyl ether (DECABDE) used in polymeric applications in electrical and electronic equipment, and assessment of the availability of potential alternatives to DECABDE. European Chemicals Bureau, Institute of Health and Consumer Protection, Joint Research Centre, European Commission, 2007.
370. F. Rahman, K.H. Langford, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, *Sci. Total Environ.* 275 (2001) 1.
371. L.G. Costa, G. Giordano, *NeuroToxicology* 32 (2011) 9.
372. G. Söderström, U. Sellström, C.A. de Wit, M. Tysklind, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 127.
373. A. Christiansson, J. Eriksson, D. Teclechiel, A. Bergman, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (2009) 312.
374. J. He, K.R. Robrock, L. Alvarez-Cohen, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4429.
375. J.A. Tokarz, M.-Y. Ahn, J. Leng, T.R. Filley, L. Nies, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1157.
376. H.M. Stapleton, B. Brazil, R.D. Holbrook, C.L. Mitchelmore, R. Benedict, A. Konstantinov, D. Potter, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4653.
377. A. Kierkegaard, L. Asplund, C.A. de Wit, M.S. McLachlan, G.O. Thomas, A.J. Sweetman, K.C. Jones, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 417.
378. F. Wang, J. Wang, J. Dai, G. Hu, J. Wang, X. Luo, B. Mai, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5655.
379. M.L. Hardy, D. Margitich, L. Ackerman, R.L. Smith, *Int. J. Toxicol.* 21 (2002) 165.
380. RTECH, 2008. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances; National Institute for Occupational Safety and Health, USA, <http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/> (accessed 17/06/2016).
381. M.L. Hardy, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 656.
382. K. Law, T. Halldorson, R. Danell, G. Stern, S. Gewurtz, M. Alaei, C. Marvin, M. Whittle, G. Tomy, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 2177.
383. H. Viberg, A. Fredriksson, E. Jakobsson, U. Oern, P. Eriksson, *Toxicol. Sci.* 76 (2003) 112.
384. H. Viberg, A. Fredriksson, P. Eriksson, *NeuroToxicology* 28 (2007) 136.
385. S.M. Dungey, L. Akintoye, Environmental risk evaluation report: 1,1'-(ethane-1,2-diyl)bis[penta-bromobenzene]. Bristol, UK; Environment Agency, 2007.
386. F.A. Pettigrew, S.D. Landry, J.S. Reed; Proceedings of the 5th Flame Retard. '92 Conference; New York, Elsevier Applied Sciences, 1992, p. 156-167.

387. US EPA, 2009. IUCLID data set for Dechlorane Plus (final revision for OxyChem test plan). <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/dechlorp/c15635rr3.pdf> (accessed 21/10/2016)
388. D. Crump, S. Chiu, L.T. Gauthier, N.J. Hickey, R.J. Letcher, S.W. Kennedy, Comp. Biochem. Physiol., Part C 154C (2011) 129.
389. Y. Zhang, J.-P. Wu, X.-J. Luo, J. Wang, S.-J. Chen, B.-X. Mai, Environ. Pollut. 159 (2011) 3647.
390. W.J. Brock, R.E. Schroeder, C.A. McKnight, J.L. VanSteenhouse, J.M. Nyberg, Int. J. Toxicol. 29 (2010) 582.
391. A. de la Torre, E. Sverko, M. Alae, M.A. Martínez, Chemosphere 82 (2011) 692.
392. OxyChem. Dechlorane Plus (all grades). Safety data sheet. MSDS No.M41759. http://msds.oxy.com/DWFiles/M41759_NA_EN%232.pdf. (accessed 07/08/2016).
393. A. Möller, Z. Xie, R. Sturm, R. Ebinghaus, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 8977.
394. A.A. Nomeir, P.M. Markham, B.I. Ghanayem, M. Chadwick, Drug Metab. Dispos. 21 (1993) 209.
395. G.T. Tomy, V.P. Palace, K. Pleskach, N. Ismail, T. Oswald, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 4913.
396. A.I. Balabanovich, M.P. Luda, G. Camino, A. Hornung, J. Anal. Appl. Pyrolysis 67 (2003) 95.
397. E.F. Davis, H.M. Stapleton, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 5739.
398. California Environmental Contaminant Biomonitoring Program (CECBP) Scientific Guidance Panel (SGP), 2008. Brominated and chlorinated organic chemical compounds used as flame retardants; p 1-32.
399. Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether), Official Journal of the European Union L042, 15/02/2003, p. 45-46.
400. R.C. Hale, M. Alae, J. Manchester-Neesvig, H. Stapleton, M. Ikononou, Environ. Int. 29 (2003) 771.
401. Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), US Department of Health and Human Services, Public Health Services, 2004.
402. C. Cleet, Environ. Health Perspect. 112 (2004) 978.
403. Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipments, Official Journal of the European Union L037, 13/02/2003, p. 19-23.
404. Commission Decision 2005/717/EC of 13 October 2005 amending for the purposes of adapting to the technical progress the Annex to Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment, Official Journal of the European Union L271, 15/10/2005, p. 48-50.
405. European Court of Justice, 2008. Judgment of the Court (Grand Chamber) of 1 April 2008 - European Parliament (C-14/06), Kingdom of Denmark (C-295/06) v Commission of the European Communities, Official Journal of the European Union C116, 09/05/2008, p. 2-3.
406. UNEP, 2009. Establishing indicative elements of a work programme to facilitate the elimination of listed brominated diphenyl ethers and the restriction or elimination

- of perfluorooctane sulfonic acid and its salts, perfluorooctane sulfonyl fluoride and other chemicals listed in Annexes A or B of the Convention at the fourth meeting of the Conference of the Parties, Conference of the Parties (COP), UNEP/POPS/COP.4-SC4/19.
<http://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/COP4/COP4Documents/tabid/531/Default.aspx> (accessed 05/07/2016).
407. Government Canada, 2015. List of Toxic Substances managed under CEPA (schedule 1); Environment and Climate Change Canada. <http://www.ec.gc.ca/toxiques-toxics/Default.asp?lang=En&n=5046470B-1> (accessed 21/06/2016).
 408. Government Canada, 2016. Polybrominated diphenyl ethers regulations, SOR/2008-218, Justice Laws Website. <http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-2008-218.pdf> (accessed 21/06/2016).
 409. US EPA, 2004. High Production Volume (HPV) Challenge Program, Test Plan. <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/dechlorp/c15635tp.pdf> (accessed 21/10/2016)
 410. ESIS, European Chemical Substance Information System; European Commission Joint Research Center, European Chemicals Bureau, 2010, <http://www.portalreach.info/enlaces/esis-european-chemicals-substances-information-system/> (accessed 21/06/2016).
 411. E. Sverko, G.T. Tomy, E.J. Reiner, Y.-F. Li, B.E. McCarry, J.A. Arnot, R.J. Law, R.A. Hites, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 5088.
 412. CEPA, 2011. Environmental Canada, Domestic Substances List. <http://www.ec.gc.ca/subsnouvelles-newssubs/default.asp?lang=En&n=C4E09AE7-1> (accessed 29/08/2016).
 413. H.-B. Moon, S.-P. Yoon, R.-H. Jung, M. Choi, Chemosphere 73 (2008) 880.
 414. S. Lacorte, M. Guillamón, E. Martínez, P. Viana, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 892.
 415. B.N. Zegers, W.E. Lewis, K. Booiij, R.H. Smittenberg, W. Boer, B.J. de, J.P. Boon, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 3803.
 416. S. Song, X. Dai, W. Wang, Y. He, Z. Liu, M. Shao, Anal. Methods 7 (2015) 9542.
 417. C. Bogdal, P. Schmid, M. Kohler, C.E. Muller, S. Iozza, T.D. Bucheli, M. Scherlinger, K. Hungerbuhler, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 6817.
 418. D. Ekeberg, H.R. Norli, C. Stene, H. Devle, L. Bergaust, J. Chromatogr. Sep. Tech. 1 (2010) 102.
 419. A. de la Torre, M.A. Concejero, M.A. Martínez, J. Environ. Sci. 24 (2012) 558.
 420. S. Bayen, G.O. Thomas, H.K. Lee, J.P. Obbard, Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 2432.
 421. J.H. Christensen, J. Platz, J. Environ. Monit. 3 (2001) 543.
 422. S. Voorspoels, A. Covaci, P. Schepens, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 4348.
 423. I. Vives, J.O. Grimalt, S. Lacorte, M. Guillamón, D. Barceló, B.O. Rosseland, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 2338.
 424. S. Harrad, M.A.-E. Abdallah, N.L. Rose, S.D. Turner, T.A. Davidson, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 9077.
 425. E. Barón, E. Eljarrat, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1248 (2012) 154.
 426. J.H. Christensen, M. Glasius, M. Pécseli, J. Platz, G. Pritzl, Chemosphere 47 (2002) 631.
 427. A. Bacaloni, L. Callipo, E. Corradini, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Lagana, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6400.

428. A. Sjödin, H. Carlsson, K. Thuresson, S. Sjoelin, A. Bergman, C. Oestman, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 448.
429. S.-J. Chen, M. Tian, J. Wang, T. Shi, Y. Luo, X.-J. Luo, B.-X. Mai, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1290.
430. A. de la Torre, G. Pacepavicius, L. Shen, E. Reiner, B. Jiménez, M. Alaei, M.A. Martínez, *Organohalogen Compd.* 72 (2010) 929.
431. N. Ali, S. Harrad, E. Goosey, H. Neels, A. Covaci, *Chemosphere* 83 (2011) 1360.
432. S. Batterman, C. Godwin, S. Chernyak, C. Jia, S. Charles, *Environ. Int.* 36 (2010) 548.
433. D. Lankova, A. Svarcova, K. Kalachova, O. Lacina, J. Pulkrabova, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta* 854 (2015) 61.
434. F.C. Calvosa, A.F. Lagalante, *Talanta* 80 (2010) 1116.
435. G. Devanathan, A. Subramanian, A. Sudaryanto, S. Takahashi, T. Isobe, S. Tanabe, *Environ. Int.* 39 (2012) 87.
436. J.-P. Antignac, R. Cariou, D. Zalko, A. Berrebi, J.-P. Cravedi, D. Maume, P. Marchand, F. Monteau, A. Riu, F. Andre, B.B. Le, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 164.
437. M. Karlsson, A. Julander, B. van Bavel, L. Hardell, *Environ. Int.* 33 (2007) 62.
438. S.-J. Chen, Y.-J. Ma, J. Wang, D. Chen, X.-J. Luo, B.-X. Mai, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 4200.
439. M.-K. Tian, X.-L. Feng, *Chin. J. Chem.* 26 (2008) 1251.
440. M.K.-Y. Li, N.-Y. Lei, C. Gong, Y. Yu, K.-H. Lam, M.H.-W. Lam, H. Yu, P.K.-S. Lam, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 197.
441. J.-X. Wang, D.-Q. Jiang, Z.-Y. Gu, X.-P. Yan, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 8.
442. J. Llorca-Porcel, G. Martínez-Sánchez, B. Álvarez, M.A. Cobollo, I. Valor, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 113.
443. Q. Zhang, T. Liang, L. Guan, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1263.
444. R.-S. Zhao, Y.-L. Liu, X.-F. Chen, J.-P. Yuan, A.-Y. Bai, J.-B. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 769 (2013) 65.
445. W.-L. Ma, L.-Y. Liu, H. Qi, D.-Z. Sun, J.-M. Shen, D.-G. Wang, Y.-F. Li, *Environ. Int.* 37 (2011) 66.
446. X. Liu, J. Li, Z. Zhao, W. Zhang, K. Lin, C. Huang, X. Wang, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2220.
447. Y. Li, J. Hu, X. Liu, L. Fu, X. Zhang, X. Wang, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2371.
448. A. Prieto, O. Telleria, N. Etxebarria, L.A. Fernández, A. Usobiaga, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 1.
449. A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 739.
450. P. Serôdio, M.S. Cabral, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 259.
451. P. Labadie, K. Tlili, F. Alliot, C. Bourges, A. Desportes, M. Chevreuil, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 865.
452. P. Novak, T. Zuliani, R. Milačič, J. Ščančar, *Anal. Chim. Acta* 827 (2014) 64.
453. M.H. Hermanson, E. Isaksson, S. Forsstrom, C. Teixeira, D.C.G. Muir, V.A. Pohjola, R.S.V. van de Wal, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7405.
454. Y. Li, G. Wei, J. Hu, X. Liu, X. Zhao, X. Wang, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 96.
455. A. Möller, Z. Xie, M. Cai, G. Zhong, P. Huang, M. Cai, R. Sturm, J. He, R. Ebinghaus, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6793.
456. N.B. Lana, A.R. Fontana, N.F. Ciocco, J.C. Altamirano, *Revista Facultad Ciencias Agrarias* 42 (2010) 85.
457. D.R. Oros, D. Hoover, F. Rodigari, D. Crane, J. Sericano, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 33.

458. Z. Xie, A. Moller, L. Ahrens, R. Sturm, R. Ebinghaus, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1820.
459. A. Salamova, R.A. Hites, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 9924.
460. J.-P. Wu, Y.-T. Guan, Y. Zhang, X.-J. Luo, H. Zhi, S.-J. Chen, B.-X. Mai, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 5490.
461. J.P. Wu, Y. Zhang, X.J. Luo, J. Wang, S.J. Chen, Y.T. Guan, B.X. Mai, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 606.
462. H. Qi, L. Liu, H. Jia, Y.-F. Li, N.-Q. Ren, H. You, X. Shi, L. Fan, Y. Ding, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2305.
463. H.-L. Jia, Y.-Q. Sun, X.-J. Liu, M. Yang, D.-G. Wang, H. Qi, L. Shen, E. Sverko, E.J. Reiner, Y.-F. Li, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 2613.
464. H.K. Hsieh, C.L. Chen, W.H. Ding, *Anal. Methods* 5 (2013) 7001.
465. G. Poma, A. Binelli, P. Volta, C. Roscioli, L. Guzzella, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 9655.
466. B.C. Kelly, M.G. Ikononou, J.D. Blair, F.A.P.C. Gobas, *Sci. Total Environ.* 401 (2008) 60.
467. G.T. Tomy, K. Pleskach, N. Ismail, D.M. Wittle, P.A. Helm, E. Sverko, D. Zaruk, C.H. Marvin, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 2249.
468. R. Rodil, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *Chemosphere* 67 (2007) 1453.
469. K. Ramu, N. Kajiwara, T. Isobe, S. Takahashi, E.-Y. Kim, B.-Y. Min, S.-U. We, S. Tanabe, *Environ. Pollut.* 148 (2007) 562.
470. H.-B. Moon, K. Kannan, S.-J. Lee, M. Choi, *Chemosphere* 66 (2007) 243.
471. I. Johansson, K. Heas-Moisán, N. Guiot, C. Munsch, J. Tronczynski, *Chemosphere* 64 (2006) 296.
472. Y. Liu, G.J. Zheng, H. Yu, M. Martin, B.J. Richardson, M.H.W. Lam, P.K.S. Lam, *Mar. Pollut. Bull.* 50 (2005) 1173.
473. J. de Boer, P.G. Wester, A. van der Horst, P.E.G. Leonards, *Environ. Pollut.* 122 (2003) 63.
474. G.T. Tomy, K. Pleskach, T. Oswald, T. Halldorson, P.A. Helm, G. MacInnis, C.H. Marvin, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3634.
475. V. Bragigand, C. Amiard-Triquet, E. Parlier, P. Boury, P. Marchand, M. El Hourch, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 615.
476. E.G. Soermo, B.M. Jenssen, E. Lie, J.U. Skaare, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2082.
477. S. Losada, F.J. Santos, M.T. Galceran, *Talanta* 80 (2009) 839.
478. P. Schmid, M. Kohler, E. Gujer, M. Zennegg, M. Lanfranchi, *Chemosphere* 67 (2007) S16.
479. J. Hajslová, J. Pulkrabová, J. Poustka, T. Cajka, T. Randák, *Chemosphere* 69 (2007) 1195.
480. B. Johnson-Restrepo, K. Kannan, R. Addink, D.H. Adams, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8243.
481. E.W. Montie, R.J. Letcher, C.M. Reddy, M.J. Moore, B. Rubinstein, M.E. Hahn, *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 1160.
482. H. Wolkers, P.J. Corkeron, S.M. Van Parijs, T. Simila, B. van Bavel, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 1582.
483. E.G. Soermo, M.P. Salmer, B.M. Jenssen, H. Hop, K. Baek, K.M. Kovacs, C. Lydersen, S. Falk-Petersen, G.W. Gabrielsen, E. Lie, J.U. Skaare, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 2502.
484. F. Rigét, K. Vorkamp, R. Dietz, S.C. Rastogi, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 1000.

485. R.J. Law, C.R. Allchin, M.E. Bennett, S. Morris, E. Rogan, *Chemosphere* 46 (2002) 673.
486. H. Peng, K. Zhang, Y. Wan, J. Hu, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 9907.
487. R.J. Law, C.R. Allchin, B.J. de, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, W.C.A. de, *Chemosphere* 64 (2006) 187.
488. A.M. Carro, R.A. Lorenzo, F. Fernández, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 93.
489. P. Hrádková, J. Pulkrabová, K. Kalachová, V. Hlousková, M. Tomaniová, J. Poustka, J. Hajslová, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62 (2012) 85.
490. R. Yang, C. Jing, Q. Zhang, Z. Wang, Y. Wang, Y. Li, G. Jiang, *Chemosphere* 83 (2011) 862.
491. P. Wang, Q. Zhang, Y. Wang, T. Wang, X. Li, L. Ding, G. Jiang, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 43.
492. J. Nácher-Mestre, R. Serrano, F. Hernández, L. Benedito-Palos, J. Pérez-Sánchez, *Anal. Chim. Acta* 664 (2010) 190.
493. H. Routti, R.J. Letcher, S. Chu, B. van Bavel, G.W. Gabrielsen, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3494.
494. J.-P. Wu, X.-J. Luo, Y. Zhang, Y. Luo, S.-J. Chen, B.-X. Mai, Z.-Y. Yang, *Environ. Int.* 34 (2008) 1109.
495. C.-H. Xiang, X.-J. Luo, S.-J. Chen, M. Yu, B.-X. Mai, E.Y. Zeng, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 616.
496. S.S. Streets, S.A. Henderson, A.D. Stoner, D.L. Carlson, M.F. Simcik, D.L. Swackhamer, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7263.
497. H. Wolkers, B. van Bavel, A.E. Derocher, O. Wiig, K.M. Kovacs, C. Lydersen, G. Lindstroem, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1667.
498. A. Covaci, K. Van de Vijver, W. DeCoen, K. Das, J.M. Bouqueneau, R. Blust, P. Schepens, *Mar. Pollut. Bull.* 44 (2002) 1157.
499. J.B. Manchester-Neesvig, K. Valters, W.C. Sonzogni, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1072.
500. U. Sellström, A. Kierkegaard, C. De Wit, B. Jansson, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1065.
501. A. Strid, C. Bruhn, E. Sverko, J. Svavarsson, G. Tomy, A. Bergman, *Chemosphere* 91 (2013) 222.
502. J.-H. Kang, J.-C. Kim, G.-Z. Jin, H. Park, S.-Y. Baek, Y.-S. Chang, *Chemosphere* 79 (2010) 850.
503. C. Munschy, K. Heas-Moisan, C. Tixier, L. Boulesteix, J. Morin, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 4618.
504. S.N. Zhou, E.J. Reiner, C. Marvin, T. Kolic, N. Riddell, P. Helm, F. Dorman, M. Misselwitz, I.D. Brindle, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 633.
505. J.-P. Wu, X.-J. Luo, Y. Zhang, M. Yu, S.-J. Chen, B.-X. Mai, Z.-Y. Yang, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 904.
506. N. Ismail, S.B. Gewurtz, K. Pleskach, D.M. Whittle, P.A. Helm, C.H. Marvin, G.T. Tomy, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 910.
507. S. Pizzini, E. Marchiori, R. Piazza, G. Cozzi, C. Barbante, *Microchem. J.* 121 (2015) 184.
508. R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de separación en química analítica, Síntesis, España*, 2002.
509. D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202.

510. T. Okumura, Y. Nishikawa, *Anal. Chim. Acta* 325 (1996) 175.
511. I. Nishi, T. Kawakami, S. Onodera, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 163.
512. M. Clara, O. Gans, S. Weiss, D. Sanz-Escribano, S. Scharf, C. Scheffknecht, *Water Res.* 43 (2009) 4760.
513. C. González-Barreiro, E. Martínez-Carballo, A. Sitka, S. Scharf, O. Gans, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 2123.
514. E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-phase extraction: Principles and Practice*, Vol. 147, John Wiley and Sons, New York, 1998.
515. C.F. Poole, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 362.
516. N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 394.
517. Oasis Sample Extraction Products: Waters. www.waters.com/waters/es_ES/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=es_Es (accessed 14/04/2016).
518. X. Peng, W. Ou, C. Wang, Z. Wang, Q. Huang, J. Jin, J. Tan, *Sci. Total Environ.* 490 (2014) 889.
519. P. Cuderman, E. Heath, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1343.
520. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Talanta* 74 (2008) 1299.
521. W. Wang, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 1174.
522. G.-G. Ying, R.S. Kookana, *Environ. Int.* 33 (2007) 199.
523. A. Beltran, R.M. Marce, P.A.G. Cormack, F. Borrull, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 72.
524. S. Taniyasu, K. Kannan, M.K. So, A. Gulkowska, E. Sinclair, T. Okazawa, N. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 89.
525. S. Nakayama, M.J. Strynar, L. Helfant, P. Egeghy, X. Ye, A.B. Lindstrom, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 5271.
526. N. Saito, K. Sasaki, K. Nakatome, K. Harada, T. Yoshinaga, A. Koizumi, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45 (2003) 149.
527. J.S. Boone, B. Guan, C. Vigo, T. Boone, C. Byrne, J. Ferrario, *J. Chromatogr. A* 1345 (2014) 68.
528. B.F. Scott, C.A. Moody, C. Spencer, J.M. Small, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6405.
529. Y. Zushi, T. Takeda, S. Masunaga, *Chemosphere* 71 (2008) 1566.
530. S.T. Wolf, W.K. Reagen, *Anal. Methods* 3 (2011) 1485.
531. K. Risha, J. Flaherty, R. Wille, W. Buck, F. Morandi, T. Isemura, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1503.
532. S. Ullah, T. Alsberg, U. Berger, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6388.
533. S. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2634.
534. K.J. Hansen, H.O. Johnson, J.S. Eldridge, J.L. Butenhoff, L.A. Dick, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1681.
535. M.F. Simcik, K.J. Dorweiler, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8678.
536. C.A. Moody, J.W. Martin, W.C. Kwan, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 545.
537. R. Quiroz, L. Arellano, J.O. Grimalt, P. Fernández, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 147.
538. J. Cristale, J. Quintana, R. Chaler, F. Ventura, S. Lacorte, *J. Chromatogr. A* 1241 (2012) 1.
539. J.B. Quintana, M. Ramil, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2014, p. 1.
540. C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M.E. Torres-Padrón, J.J. Santana-Rodríguez, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 731.

541. J.M. Kokosa, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 2.
542. J.B. Quintana, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1447.
543. E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
544. Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 32.
545. M. Saraji, S. Mirmahdieh, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 988.
546. Y. Li, G. Wei, X. Wang, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2698.
547. M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
548. J.-H. Guo, X.-H. Li, X.-L. Cao, Y. Li, X.-Z. Wang, X.-B. Xu, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3038.
549. J.H. Guo, X.H. Li, X.L. Cao, L. Qu, D.K. Hou, X.B. Xu, *Chem.* 53 (2010) 2600.
550. R.-S. Zhao, X. Wang, J. Sun, S.-S. Wang, J.-P. Yuan, X.-K. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1627.
551. R.-S. Zhao, X. Wang, J. Sun, J.-P. Yuan, S.-S. Wang, X.-K. Wang, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1842.
552. R.-S. Zhao, X. Wang, J. Sun, C. Hu, X.-K. Wang, *Microchim. Acta* 174 (2011) 145.
553. C. Zheng, J. Zhao, P. Bao, J. Gao, J. He, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3830.
554. H. Wang, A. Zhang, W. Wang, M. Zhang, H. Liu, X. Wang, *J. AOAC Int.* 96 (2013) 459.
555. R. Celano, A.L. Piccinelli, L. Campone, L. Rastrelli, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 26.
556. S.S. Caldas, C. Rombaldi, J.L.d.O. Arias, L.C. Marube, E.G. Primel, *Talanta* 146 (2016) 676.
557. B. Hashemi, M. Shamsipur, N. Fattahi, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 1414.
558. H. Cabuk, M. Akyuez, S. Ata, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2645.
559. J.I. Cacho, N. Campillo, P. Vinas, M. Hernandez-Cordoba, *Talanta* 146 (2016) 568.
560. C.A. Galinaro, F.M. Pereirab, E.M. Vieiraa, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 2205.
561. R. Jain, M.K.R. Mudiam, A. Chauhan, R. Ch, R.C. Murthy, H.A. Khan, *Food Chem.* 141 (2013) 436.
562. M.K. Reddy Mudiam, R. Jain, R. Singh, *Anal. Methods* 6 (2014) 1802.
563. M.S.F. Santos, J.L. Moreira, L.M. Madeira, A. Alves, *J. Anal. Chem.* 70 (2015) 1390.
564. A. Zhao, X. Wang, M. Ma, W. Wang, H. Sun, Z. Yan, Z. Xu, H. Wang, *Microchim. Acta* 177 (2012) 229.
565. N. Cabaleiro, I. De la Calle, C. Bendicho, I. Lavilla, *Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 34.
566. Y. Yamini, A. Saleh, M. Rezaee, L. Ranjbar, M. Moradi, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 2623.
567. U. Kotowska, J. Kapelewska, J. Sturgulewska, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 660.
568. A.R. Fontana, R.G. Wuilloud, L.D. Martínez, J.C. Altamirano, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 147.
569. G. Hoch, B. Kok, *Arch. Biochem. Biophys.* 101 (1963) 160.
570. T. Barri, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 16.
571. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650.
572. A. Esrafil, Y. Yamini, M. Ghambarian, M. Moradi, *Chromatographia* 77 (2014) 317.
573. A. Prichodko, K. Jonusaite, V. Vickackaite, *Cent. Eur. J. Chem.* 7 (2009) 285.
574. M. Díaz-Álvarez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93 (2013) 727.
575. R.-S. Zhao, J.-P. Yuan, H.-F. Li, X. Wang, T. Jiang, J.-M. Lin, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2911.
576. Q. Xiao, B. Hu, J. Duan, M. He, W. Zu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1740.

577. N. Fontanals, T. Barri, S. Bergstroem, J.-A. Joensson, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 41.
578. B. Hauser, P. Popp, *J Sep Sci* 24 (2001) 551.
579. B. Hauser, P. Popp, E. Kleine-Benne, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 27.
580. R.P. Belardi, J.B. Pawliszyn, *Water Pollut. Res. J. Can.* 24 (1989) 179.
581. J. López-Darias, V. Pino, Y. Meng, J.L. Anderson, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7189.
582. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 107.
583. G. Álvarez-Rivera, M. Llompart, C. García-Jares, M. Lores, *J. Chromatogr. A* 1349 (2014) 105.
584. K. Saito, E. Uemura, A. Ishizaki, H. Kataoka, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 141.
585. M. Monteleone, A. Naccarato, G. Sindona, A. Tagarelli, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 160.
586. M. Polo, V. Casas, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 121.
587. M. Polo, G. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1054.
588. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737.
589. A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 74 (2008) 1498.
590. T. Gorecki, X. Yu, J. Pawliszyn, *Analyst* 124 (1999) 643.
591. K. Grob, A. Habich, *J. Chromatogr.* 321 (1985) 45.
592. F. Herrmann, P. Matousek, O. Dufka, J. Churacek, *J. Chromatogr.* 370 (1986) 49.
593. I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1002.
594. T.L. ter Laak, F.J.M. Busser, J.L.M. Hermens, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3859.
595. R.S. Brown, P. Akhtar, J. Kerman, L. Hampel, I.S. Kozin, L.A. Villierius, H.J.C. Klammer, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4097.
596. L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 17.
597. A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, *Anal. Chim. Acta* 716 (2012) 119.
598. M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2589.
599. P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1141.
600. J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahia, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27.
601. P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, *Water Res.* 40 (2006) 2572.
602. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2642.
603. L.P. Melo, A.M. Nogueira, F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 57.
604. V.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 2.
605. R. Rodil, M. Möder, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 81.
606. M.S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Water Res.* 38 (2004) 1679.
607. F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 77 (2008) 765.
608. A.R. Chaves, S.M. Silva, R.H.C. Queiroz, F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, *J. Chromatogr. B* 850 (2007) 295.
609. B. Kolahgar, A. Hoffmann, A.C. Heiden, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 225.
610. C. Yu, B. Hu, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 147.
611. N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. Heiden, A. Hoffman, *Analyst* 126 (2001) 1652.

612. V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
613. C. Franc, F. David, G. de Revel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3318.
614. R.H.C. Queiroz, C. Bertucci, W.R. Malfara, S.A.C. Dreossi, A.R. Chaves, D.A.R. Valerio, M.E.C. Queiroz, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 428.
615. L. Brossa, R.M. Marce, F. Borrull, E. Pocurull, *Chromatographia* 61 (2005) 61.
616. P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 1.
617. P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 307.
618. M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 175.
619. N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 603.
620. R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 41.
621. M.S. van Pinxteren, L. Montero, S. Jaesch, H. Paschke, P. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 767.
622. S. Triñanes, T. Pena, C. Casais, C. Mejuto, *Talanta* 132 (2015) 433.
623. E. Villaverde-de-Sáa, I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 740 (2012) 50.
624. C. Valls-Cantenys, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, M. Iglesias, V. Salvado, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 770 (2013) 85.
625. J. Casado, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1299 (2013) 40.
626. A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, M. Möder, I. Rodríguez, *Talanta* 122 (2014) 264.
627. M.I. Carpinteiro, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2825.
628. R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1198-1199 (2008) 21.
629. M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317.
630. M. Abdel-Rehim, *Anal. Chim. Acta* 701 (2011) 119.
631. M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2569.
632. L. Nováková, H. Vlcková, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8.
633. I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, S. Schrader, M. Möder, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 59.
634. H.F. Schroder, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 131.
635. J.C.W. Lam, R.K.F. Lau, M.B. Murphy, P.K.S. Lam, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6944.
636. M. Llorca, M. Farré, Y. Picó, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7195.
637. L.S. Haug, S. Salihovic, I.E. Jogsten, C. Thomsen, B. van Bavel, G. Lindstroem, G. Becher, *Chemosphere* 80 (2010) 1137.
638. C. Liu, K.Y.H. Gin, V.W.C. Chang, B.P.L. Goh, M. Reinhard, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 9758.
639. A.J. Ramírez, R.A. Brain, S. Usenko, M.A. Mottaleb, J.G. O'Donnell, L.L. Stahl, J.B. Wathen, B.D. Snyder, J.L. Pitt, P. Perez-Hurtado, L.L. Dobbins, B.W. Brooks, C.K. Chambliss, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2587.
640. C.N. Stevenson, L.A. MacManus-Spencer, T. Luckenbach, R.G. Luthy, D. Epel, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5580.
641. M.R. Lee, C.Y. Lin, Z.G. Li, T.F. Tsai, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 244.
642. S.-P. Wang, C.-L. Chang, *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 85.
643. W.-L. Liu, B.-H. Hwang, Z.-G. Li, J.-F. Jen, M.-R. Lee, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7857.

644. T. Katsumata, A. Nakata, Y. Iwasaki, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *Bunseki Kagaku* 55 (2006) 955.
645. R. Rodil, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R.C. Torrijos, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2259.
646. A. Abu-Samra, J.S. Morris, S.R. Koirtiyohann, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1475.
647. C.C. Teo, W.P.K. Chong, Y.S. Ho, *Metabolomics* 9 (2013) 1109.
648. A. Azzouz, E. Ballesteros, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 231.
649. A. Azzouz, E. Ballesteros, *Sci. Total Environ.* 419 (2012) 208.
650. T.J. Brown, C.A. Kinney, *Int. J. Geosci.* 2 (2011) 267.
651. B. Delgado, V. Pino, J.L. Anderson, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, *Talanta* 99 (2012) 972.
652. S. Morales, P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 128.
653. S. Morales-Muñoz, J.L. Luque-García, M.J. Ramos, M.J. Martínez-Bueno, M.D. Luque de Castro, *Chromatographia* 62 (2005) 69.
654. R.A. Pérez, B. Alberio, E. Miguel, C. Sánchez-Brunete, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2347.
655. S.L. Rice, S. Mitra, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 125.
656. A. Azzouz, E. Ballesteros, *J. Chromatogr. B* 891-892 (2012) 12.
657. M. Sajid, C. Basheer, K. Narasimhan, M. Choolani, H.K. Lee, *J. Chromatogr. B* 1000 (2015) 192.
658. M.I. Beser, O. Pardo, J. Beltran, V. Yusa, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4847.
659. P. Novak, T. Zuliani, R. Milacic, J. Scancar, *Anal. Chim. Acta* 915 (2016) 27.
660. E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, I. Zabaleta, A. Vallejo, L.A. Fernández, A. Prieto, O. Zuloaga, *Talanta* 119 (2014) 53.
661. X. Li, X.M. Li, X.X. Yang, Q. Li, B. Huang, X.J. Pan, *Anal. Methods* 6 (2014) 9658.
662. D. Lu, C. Feng, Y. Lin, D. Wang, H.S.S. Ip, X. Qiu, G. Wang, J. She, *Chemosphere* 114 (2014) 327.
663. J. Regueiro, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1095.
664. N. Tapie, H. Budzinski, K. Menach, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2169.
665. S. Bayen, H.K. Lee, J.P. Obbard, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 291.
666. A.M. Carro, R.A. Lorenzo, F. Fernández, R. Phan-Tan-Luu, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1021.
667. N.M. Fajar, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, F. Fernández, R. Cela, *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 1015.
668. W. Vetter, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4951.
669. C. Han, B. Xia, X. Chen, J. Shen, Q. Miao, Y. Shen, *Food Chem.* 194 (2016) 1199.
670. W. Li, Y. Shi, L. Gao, J. Liu, Y. Cai, *J. Hazard. Mater.* 300 (2015) 29.
671. X. Hu, D. Hu, B. Wu, C. Lin, *J. Environ. Prot.* 5 (2014) 936.
672. P. Wardrop, P.D. Morrison, J.G. Hughes, B.O. Clarke, *J. Chromatogr. B* 990 (2015) 1.
673. R. Sührling, A. Möller, M. Freese, J.D. Pohlmann, H. Wolschke, R. Sturm, Z. Xie, R. Hanel, R. Ebinghaus, *Chemosphere* 90 (2013) 118.
674. T.M. Kolic, L. Shen, K. MacPherson, L. Fayez, T. Gobran, P.A. Helm, C.H. Marvin, G. Arsenaault, E.J. Reiner, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 83.
675. M.J. La Guardia, R.C. Hale, E. Harvey, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 6663.
676. S. Lacorte, M.G. Ikonomou, M. Fischer, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 337.
677. Y.P. Liu, J.G. Li, Y.F. Zhao, Y.N. Wu, L.Y. Zhu, *Food Addit. Contam.* 26 (2009) 1180.

678. US EPA, 1996. Method 3545, Pressurized fluid extraction (PLE), p. 1-9. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3545a.pdf> (accessed 13/05/2016)
679. US EPA, 2007. Method 1614, Brominated diphenyl ethers in water soil, sediment and Tissue by HRGC/HRMS, Washington, DC.
680. ISO 22032:2006. Water quality - determination of selected polybrominated diphenyl ethers in sediment and sewage sludge - method using extraction and gas chromatography/mass spectrometry, International Organization for Standardization, December, 2006.
681. S.A. Barker, A.R. Long, J. Liq. Chromatogr. 15 (1992) 2071.
682. S.A. Barker, J. Chromatogr. A 885 (2000) 115.
683. E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, L. Ramos, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 96.
684. M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 963.
685. A.L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Lagana, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2521.
686. B. Albero, R.A. Pérez, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, J. Hazard. Mater. 239-240 (2012) 48.
687. I. González-Mariño, I. Rodríguez, J.B. Quintana, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 2289.
688. C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, B. Albero, J.L. Tadeo, J. Sep. Sci. 33 (2010) 2768.
689. M. Celeiro, E. Guerra, J.P. Lamas, M. Lores, C. García-Jares, M. Llompart, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 1.
690. L. Sánchez-Prado, G. Álvarez-Rivera, J.P. Lamas, M. Lores, C. García-Jares, M. Llompart, Anal. Bioanal. Chem. 401 (2011) 3293.
691. R. Aznar, B. Albero, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, I. Martín-Girela, J.L. Tadeo, Environ. Sci. Pollut. Res. (2016) Ahead of Print.
692. F. Vela-Soria, O. Ballesteros, F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, A. Navalón, Microchem. J. 118 (2015) 32.
693. F. Vela-Soria, I. Rodríguez, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, R. Cela, A. Navalón, J. Chromatogr. A 1371 (2014) 39.
694. A.I. García-Valcárcel, E. Molero, M.C. Escorial, M.C. Chueca, J.L. Tadeo, Sci. Total Environ. 472 (2014) 20.
695. A. Iparraguirre, R. Rodil, J.B. Quintana, E. Bizkarguenaga, A. Prieto, O. Zuloaga, R. Cela, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 1360 (2014) 57.
696. C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, J. Sep. Sci. 32 (2009) 109.
697. R.M.A.P.S. Dassanayake, H. Wei, R.C. Chen, A. Li, Anal. Chem. 81 (2009) 9795.
698. J.A. Nanes, Y. Xia, R.M.A.P.S. Dassanayake, R.M. Jones, A. Li, C.J. Stodgell, C.K. Walker, S. Szabo, S. Leuthner, M.S. Durkin, J. Moye, R.K. Miller, Chemosphere 106 (2014) 20.
699. Q. Liu, J. Shi, J. Sun, T. Wang, L. Zeng, N. Zhu, G. Jiang, Anal. Chim. Acta 708 (2011) 61.
700. Y. Moliner-Martínez, P. Campins-Falco, C. Molins-Lagua, L. Segovia-Martínez, A. Seco-Torrecillas, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6741.
701. H. Ziarrusta, M. Olivares, A. Delgado, O. Posada-Ureta, O. Zuloaga, N. Etxebarria, J. Chromatogr. A 1391 (2015) 18.
702. P. Husek, J. Chromatogr. B 717 (1998) 57.
703. F. Orata, *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis*, in: *Advanced gas chromatography-progress in agricultural, biomedical and industrial applications*, chapter 5, M.A. Mohd, (Eds.), InTech, 2012, p. 83.

704. R.J. Wells, J. Chromatogr. A 843 (1999) 1.
705. A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, J. Chromatogr. A 1296 (2013) 70.
706. Agilent Technologies, 2002. Analysis of pharmacologically relevant compounds using GC ;SD - EI/PCI/NCI, Compendium of applications. https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/GC_handbuch_E.pdf (accessed 24/05/2016).
707. D. Skoog, J.J. Leary, *Análisis instrumental*, Mc Graw Hill, Madrid, 1994.
708. P. Emnet, S. Gaw, G. Northcott, B. Storey, L. Graham, Environ. Res. 136 (2015) 331.
709. B. Subedi, M.A. Mottaleb, C.K. Chambliss, S. Usenko, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6278.
710. M.C. Pietrogrande, G. Basaglia, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 1086.
711. N.S. Chary, S. Herrera, M.J. Gómez, A.R. Fernández-Alba, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 1993.
712. C.A. Moody, J.A. Field, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 2800.
713. M. Ylinen, H. Hanhijärvi, P. Peura, O. Ramo, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 14 (1985) 713.
714. A.O. de Silva, S.A. Mabury, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 6538.
715. A. Jahnke, U. Berger, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 410.
716. R. Chaler, R. Vilanova, M. Santiago-Silva, P. Fernandez, J.O. Grimalt, J. Chromatogr. A 823 (1998) 73.
717. J. de Boer, C. Allchin, R. Law, B. Zegers, J.P. Boon, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 591.
718. A. Covaci, S. Voorspoels, J. de Boer, Environ. Int. 29 (2003) 735.
719. X. Liu, J. Hu, C. Huang, H. Wang, X. Wang, J. Sep. Sci. 32 (2009) 4213.
720. D.A. Skoog, F.J. Holler, *Principios de Análisis Instrumental*, Mc Graw Hill, Madrid, 2001.
721. T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Anal. Chem. 76 (2004) 704.
722. N. Gilart, P.A.G. Cormack, R.M. Marce, F. Borrull, N. Fontanals, J. Chromatogr. A 1295 (2013) 42.
723. G.C.C. Yang, H.-J. Tsai, F.-K. Chang, Environ. Monit. Assess. 187 (2015) 1.
724. J.M. Flaherty, P.D. Connolly, E.R. Decker, S.M. Kennedy, M.E. Ellefson, W.K. Reagen, B. Szostek, J. Chromatogr. B 819 (2005) 329.
725. I. Zabaleta, E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, P. Navarro, A. Prieto, L.A. Fernández, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A 1331 (2014) 27.
726. B. Liu, H. Zhang, L. Xie, J. Li, X. Wang, L. Zhao, Y. Wang, B. Yang, Sci. Total Environ. 524-525 (2015) 1.
727. A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, S. van Leeuwen, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5913.
728. N. Luque, A. Ballesteros-Gómez, S. van Leeuwen, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3774.
729. U. Berger, I. Langlois, M. Oehme, R. Kallenborn, Eur. J. Mass Spectrom. 10 (2004) 579.
730. M.-H. Li, Environ. Toxicol. 24 (2009) 95.
731. L. Debrauwer, A. Riu, M. Jouahri, E. Rathahao, I. Jouanin, J.-P. Antignac, R. Cariou, B. Le Bizec, D. Zalko, J. Chromatogr. A 1082 (2005) 98.
732. A. Riu, D. Zalko, L. Debrauwer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 2133.
733. A.F. Lagalante, T.D. Oswald, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2249.
734. D.R. Kester, I.W. Duedall, C. D.N., R.M. Pytkowicz, Limnol. Oceanogr. 12 (1967) 176.

735. SANCO 12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, European Commission, 2013. http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf (accessed 15/08/2016).
736. SANTE 11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, European Commission, 2015. http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf (accessed 15/08/2016).
737. G. Arsenault, A. McAlees, R. McCrindle, N. Riddell, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 3803.
738. R. Rodil, J.B. Quintana, T. Reemtsma, Anal. Chem. 77 (2005) 3083.
739. A. Covaci, S. Voorspoels, L. Ramos, H. Neels, R. Blust, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 145.
740. I. Fulara, M. Czaplicka, J. Sep. Sci. 35 (2012) 2075.
741. T. Geens, N. Ali, L. Roosens, H. Neels, A. Covaci, Talanta 81 (2010) 1865.
742. M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 137.
743. T. Henriksen, B. Svensmark, B. Lindhardt, R.K. Juhler, Chemosphere 44 (2001) 1531.
744. I. Rodríguez, M.P. Llompart, R. Cela, J. Chromatogr. A 885 (2000) 291.
745. J.B. Quintana, T. Reemtsma, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 22.
746. T. Einsle, H. Paschke, K. Bruns, S. Schrader, P. Popp, M. Möder, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 196.
747. C. Pizarro, J.M. González-Sáiz, N. Pérez-del-Notario, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 8.
748. J.B. Quintana, R. Rodil, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1283.
749. G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical experimental desing in drugs*, Marcel Dekker, New York, 1999.
750. E. Villaverde-de-Sáa, C. Valls-Cantenys, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, J. Chromatogr. A 1300 (2013) 85.
751. D.B. Hibbert, J. Chromatogr. B 910 (2012) 2.
752. S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandao, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, Anal. Chim. Acta 597 (2007) 179.
753. I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. Chromatogr. A 985 (2003) 265.
754. T. Reemtsma, J.B. Quintana, *Analytical methods for polar pollutants*, in: *Organic pollutants in the water cycle. Properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*, chapter 1, T. Reemtsma, M. Jekel (Eds.), Wiley VCH, Weinheim, 2006, p. 1.
755. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 75 (2003) 3019.
756. Commision Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities L067, 17/08/2002, p. 8-36.
757. J.M. Brausch, G.M. Rand, Chemosphere 82 (2011) 1518.
758. R. Rodil, M. Möder, J. Chromatogr. A 1178 (2008) 9.

759. K.J. Hansen, L.A. Clemen, M.E. Ellefson, H.O. Johnson, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 766.
760. E. Villaverde-de-Sáa, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Ferrero-Refojos, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 509.
761. J.B. Quintana, T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 110.
762. J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 19.
763. C.A. Moody, W.C. Kwan, J.W. Martin, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2200.
764. N. Theobald, W. Gerwinski, C. Caliebe, M. Haarich, *Development and validation of a method for the determination of polyfluorinated organic substances in sea water, sediments and biota. Occurrence of these compounds in the North and Baltic seas*, Scientific report 202 22 213 of the German Federal Environmental Agency UBA-FB 00 001049, Vol. 625, <http://www.umweltbundesamt.de>, Dessau-Roßlau, 2007.
765. ISO 25101:2009. Water quality - Determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) - method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry, International Organization for Standardization, March 2009.
766. S.F. Nakayama, M.J. Strynar, J.L. Reiner, A.D. Delinsky, A.B. Lindstrom, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4103.
767. S. Taniyasu, K. Kannan, L.W.Y. Yeung, K.Y. Kwok, P.K.S. Lam, N. Yamashita, *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 221.
768. T.R.I. Cataldi, D. Orlando, D. Nardiello, A. Rubino, G. Bianco, S. Abate, R. Ciriello, A. Guerrieri, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 129.
769. S.L.C. Ferreira, W.N.L. Dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 63 (2004) 1061.
770. R. Guo, E.J. Reiner, S.P. Bhavsar, P.A. Helm, S.A. Mabury, E. Braekevelt, S.A. Tittlemier, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2699.
771. L. Li, C. Cheng, T. Xiang, M. Tang, W. Zhao, S. Sun, C. Zhao, *J. Membr. Sci.* 405-406 (2012) 261.
772. P. López, S.A. Brandsma, P.E.G. Leonards, J. de Boer, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 871.
773. L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 103.
774. C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 241.
775. M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6986.
776. L. Shen, E.J. Reiner, P.A. Helm, C.H. Marvin, B. Hill, X. Zhang, K.A. MacPherson, T.M. Kolic, G.T. Tomy, I.D. Brindle, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3333.



ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ECUACIONES



Tabla II.1	Estructuras y propiedades físico-químicas de parabenos y triclosán.	29
Tabla II.2	Rango de concentraciones (ng L^{-1}) detectadas de parabenos en muestras de agua.	40
Tabla II.3	Rango de concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{dw}$) detectadas de parabenos en muestras de peces.	43
Tabla II.4	Rango de concentraciones (ng L^{-1}) detectadas de triclosán en muestras de aguas.	45
Tabla II.5	Rango de concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{ww}$) detectadas de triclosán en muestras de biota.	47
Tabla II.6	Estructuras y propiedades físico-químicas de los PFASs.	51
Tabla II.7	Normas de calidad ambiental para el PFOS en agua y biota según la Directiva 2013/39/EU.	55
Tabla II.8	Concentraciones (ng L^{-1}) de PFASs en muestras de aguas.	61
Tabla II.9	Concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{ww}$) de PFASs en muestras de biota.	64
Tabla II.10	Resumen de los grupos homólogos de PBDEs y de alguna de sus características.	67
Tabla II.11	Estructuras y propiedades físico-químicas de los FRs.	70 - 71
Tabla II.12	Concentraciones (ng L^{-1}) de PBDEs en muestras de aguas.	77
Tabla II.13	Concentraciones (ng L^{-1}) de NFRs en muestras de aguas.	78
Tabla II.14	Concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{ww}$) de PBDEs de biota.	83
Tabla II.15	Concentraciones ($\text{ng g}^{-1} \text{ww}$) de NFRs de biota.	84
Tabla II.16	Adsorbentes de sílice enlazada más comunes en SPE.	92
Tabla II.17	Adsorbentes poliméricos más comunes empleados en SPE.	94
Tabla II.18	Estudios de determinación de PFASs en aguas mediante SPE.	101 - 102
Tabla II.19	Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de agua mediante GC-MS o GC-MS/MS.	158
Tabla II.20	Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de biota mediante GC-MS o GC-MS/MS.	159
Tabla II.21	Condiciones empleadas para la determinación de PFCA's en muestras de agua mediante GC-MS o GC-MS/MS.	161
Tabla II.22	Condiciones empleadas para la determinación de FRs en muestras de agua mediante GC-MS o GC-MS/MS.	163
Tabla II.23	Condiciones empleadas para la determinación de FRs en muestras de biota mediante GC-MS o GC-MS/MS.	164
Tabla II.24	Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de agua mediante LC-MS o LC-MS/MS.	168
Tabla II.25	Condiciones empleadas para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de biota mediante LC-MS o LC-MS/MS.	169

Tabla II.26	Condiciones empleadas para la determinación de PFASs en muestras de agua mediante LC-MS o LC-MS/MS.	171
Tabla II.27	Condiciones empleadas para la determinación de PFASs en muestras de biota mediante LC-MS o LC-MS/MS.	172
Tabla III.1	Parámetros cromatográficos empleados en la determinación de parabenos y triclosán mediante GC.	189
Tabla III.2	Parámetros operacionales empleados en la determinación de parabenos y triclosán mediante MS/MS.	189
Tabla III.3	Condiciones para la determinación de parabenos y triclosán en aguas mediante GC-(EI)-MS/MS(IT) modo no resonante.	190
Tabla III.4.	Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de parabenos.	191
Tabla III.5	Parámetros operacionales comunes empleados en la determinación de parabenos mediante MS/MS.	191
Tabla III.6	Condiciones para la determinación de parabenos en moluscos mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).	192
Tabla III.7	Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de los PFASs.	194
Tabla III.8	Parámetros operacionales comunes empleados en la determinación de PFASs mediante MS/MS.	194
Tabla III.9	Condiciones para la determinación de PFASs en aguas y moluscos mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).	195
Tabla III.10	Parámetros cromatográficos empleados en la determinación de FRs.	197
Tabla III.11	Parámetros operacionales empleados en la determinación de FRs mediante (NCI)-MS.	198
Tabla III.12	Condiciones para la determinación de FRs en aguas y moluscos mediante GC-(NCI)-MS(Q).	198
Tabla IV.1	Parámetros de las rectas de calibrado, repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de parabenos (corrección con ISs) obtenidos mediante el sistema LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).	219
Tabla IV.2	Parámetros de las rectas de calibrado (corrección con ISs), repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de los PFASs obtenidos mediante el sistema LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).	222
Tabla IV.3	Parámetros de las rectas de calibrado, repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de los FRs obtenidos mediante el sistema GC-(NCI)-MS(Q).	226
Tabla IV.4	Parámetros de las rectas de calibrado, repetibilidad (RSD) y LODs y LOQs de los FRs obtenidos mediante el sistema GC-(EI)-MS(Q).	227

Tabla IV.5	Plan de experimentación del diseño y dominio experimental.	238
Tabla IV.6	Importancia relativa (con sus signos) de los efectos principales de los factores y de las interacciones de segundo orden en el diseño Box-Behnken.	239
Tabla IV.7	Parámetros de las rectas de calibrado, eficacias de extracción, factor de concentración (F.C.), repetibilidad (RSD (%)), recuperaciones relativas, LODs y LOQs (ng L^{-1}) para el procedimiento MASE-(LVI)-GC-(EI)-MS/MS(IT).	244
Tabla IV.8	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de parabenos y triclosán en muestras de aguas residual y superficial ($n=4$).	248
Tabla IV.9	Plan de experimentación del diseño y dominio experimental.	256
Tabla IV.10	Importancia relativa (con sus signos) de los efectos principales de los factores y de las interacciones de segundo orden en el diseño Box-Behnken.	257
Tabla IV.11	Concentración (ng) de los analitos de interés (parabenos) presentes en los blancos.	261
Tabla IV.12	Recuperaciones relativas para mejillón, almeja y berberecho, y LODs y LOQs (ng g^{-1}) referidos a dw y ww del método para parabenos.	263
Tabla IV.13	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) de parabenos en muestras reales ($n=3$).	266
Tabla IV.14	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $\text{ng g}^{-1} \text{ ww}$) de parabenos en muestras reales ($n=3$).	266
Tabla IV.15	LODs y LOQs (ng L^{-1}) del método analítico de extracción con ad/absorbentes poliméricos seguido de determinación mediante LC-MS/MS para PFASs.	285
Tabla IV.16	Parámetros de las rectas de calibrado, eficacia de extracción, repetibilidad (RDS (%)), recuperaciones relativas, LODs y LOQs (ng L^{-1}) para el método de extracción con adsorbentes poliméricos (PES) seguido de determinación mediante LC-(ESI)-MS/MS(QqQ).	287
Tabla IV.17	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de PFASs en muestras de mar, río y ría ($n=3$).	289
Tabla IV.18	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de PFASs en muestras de influente integrado ($n=3$).	290
Tabla IV.19	Diferentes protocolos estudiados para la selección del cartucho y del procedimiento de lavado.	301
Tabla IV.20	Recuperaciones (%), RSD (%), LODs y LOQs del proceso SPE-LC-(ESI)-MS/MS(QqQ) para PFASs tras la corrección con los correspondientes IS (2 ng L^{-1}).	304
Tabla IV.21	Concentraciones ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de PFASs en muestras de aguas de río y mar.	307
Tabla IV.22	Eficacia relativa (%) de los PFASs empleando diferentes combinaciones de disolventes y adsorbentes.	311
Tabla IV.23	Dominio experimental y plan de experimentación del diseño.	313
Tabla IV.24	Importancia relativa (con sus signos) de los efectos principales de los factores y de las interacciones de segundo orden en el diseño Doehlert.	314

Tabla IV.25	Recuperaciones relativas (%) (RSD) para mejillón, almeja y berberecho, y LODs y LOQs (ng g^{-1}) referidos a dw y dw del método MSPD-LC-MS/MS para los PFASs.	321
Tabla IV.26	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} dw) de muestra con adición (50 ng g^{-1}) envejecida mediante extracción por el protocolo recién optimizado de MSPD frente a los resultados obtenidos empleando el método de extracción por par iónico.	322
Tabla IV.27	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} dw) de PFASs en muestras reales.	324
Tabla IV.28	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} ww) de PFASs en muestras reales.	325
Tabla IV.29	Parámetros de las rectas de calibrado, factor de concentración (F.C.), eficacia de extracción, repetibilidad (RSD (%)), LODs y LOQs para el método de extracción con absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q), empleando PDMS como material extractante y tras la corrección con los correspondientes ISs (100 ng L^{-1}).	341
Tabla IV.30	Recuperaciones relativas (%) (RSD) del método de extracción con absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs tras la corrección de la señal con los correspondientes ISs.	345
Tabla IV.31	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng L^{-1}) de FRs en muestras de ría, río, mar, efluente e influente ($n=3$).	347
Tabla IV.32	Cantidad de residuo seco (%) en los extractos empleando Florisil y sílice con adición controlada de agua Milli-Q y H_2SO_4 , respectivamente.	356
Tabla IV.33	Recuperaciones (RSD), LODs y LOQs (ng g^{-1}) en dw y ww del método MSPD-GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs en muestras de mejillón, almeja y berberecho.	361
Tabla IV.34	Comparación entre concentraciones certificadas y experimentales ($\bar{x} \pm 2\text{-SD}$ ng g^{-1} ww) de dos CRMs: tejidos de mejillón (SRM 2977) y salmón (WMF-01).	363
Tabla IV.35	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} dw) de los FRs en muestras reales.	364
Tabla IV.36	Concentración ($\bar{x} \pm \text{SD}$, ng g^{-1} ww) de los FRs en muestras reales.	365

Figura II.1	Clasificación de PFASs.	49
Figura II.2	Propuesta de circulación de los PFASs en el medioambiente.	57
Figura II.3	Etapas típicas de un procedimiento SPE.	89
Figura II.4	Estructuras del adsorbente polimérico Oasis® HLB y de los polímeros de modo mixto derivados.	95
Figura II.5	Etapas en las técnicas de extracción no exhaustivas.	105
Figura II.6	Montaje comercial de MASE.	116
Figura II.7	Mecanismo de extracción de los analitos del procedimiento MASE.	116
Figura II.8	Estructuras de polímeros porosos empleados como ad/absorbentes.	123
Figura II.9	Procedimientos de extracción y desorción de la técnica de extracción con ad/absorbentes poliméricos de bajo coste.	125
Figura II.10	Etapas típicas de montaje de la técnica MSPD.	140
Figura II.11	Estructuras de los derivatizantes de sililación más empleados.	149
Figura II.12	Reacción de derivatización entre derivados fenólicos y MTBSTFA.	149
Figura II.13	Reacción de derivatización entre derivados fenólicos y agentes alquilantes.	149
Figura II.14	Reacción de derivatización entre derivados fenólicos y agentes acilantes.	150
Figura II.15	Reacciones del metano con los electrones y con las correspondientes moléculas.	153
Figura II.16	Reacciones en NCI.	154
Figura III.1	Membranas comerciales (derecha) y membranas de LDPE (izquierda).	200
Figura III.2	Esquema optimizado de la extracción de parabenos y triclosán en aguas mediante MASE.	201
Figura III.3	Esquema optimizado de la extracción de parabenos en moluscos mediante MSPD.	203
Figura III.4	Esquema optimizado de la extracción de los PFASs en aguas mediante extracción con adsorbentes poliméricos de bajo coste.	205
Figura III.5	Esquema optimizado de la extracción de PFASs en aguas mediante SPE.	207
Figura III.6	Esquema optimizado de la extracción de PFASs en moluscos mediante MSPD.	209
Figura III.7	Esquema optimizado de la extracción de FRs en aguas mediante extracción con adsorbentes poliméricos de bajo coste (*Adición en muestra, excepto ría y mar).	211
Figura III.8	Esquema optimizado de la extracción de FRs en moluscos mediante MSPD.	213

Figura IV.1	Cromatograma de un patrón de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de parabenos y sus correspondientes ISs, inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección.	218
Figura IV.2	Cromatograma de un patrón de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PFASs inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección fijadas para el método de MSPD.	221
Figura IV.3	Cromatograma de un patrón de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para los analitos marcados isotópicamente inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección fijadas para el método de MSPD.	221
Figura IV.4	Cromatograma de un patrón de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de FRs inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección empleando NCI como modo de ionización.	224
Figura IV.5	Cromatograma de un patrón de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de FRs inyectado bajo condiciones óptimas de separación y detección empleando EI como modo de ionización.	225
Figura IV.6	Estructuras de los agentes derivatizantes empleados en el estudio.	230
Figura IV.7	Cromatograma de iones extraídos: a) de los analitos sin derivatizar, y de los analitos derivatizados utilizando b) MTBSTFA, c) <i>i</i> BCF y d) Ac_2O . Identificación de compuestos: 1. MeP, 2. EtP, 3. <i>i</i> -PrP, 4. <i>n</i> -PrP, 5. <i>i</i> -BuP, 6. <i>n</i> -BuP, 7. BzP y 8. TCS.	231
Figura IV.8	Espectros de masas del <i>n</i> -PrP: a) sin derivatizar, y derivatizado con b) MTBSTFA, c) <i>i</i> BCF y d) Ac_2O .	232
Figura IV.9	Espectros de masas del TCS: a) sin derivatizar, y derivatizado con b) MTBSTFA, c) <i>i</i> BCF y d) Ac_2O .	233
Figura IV.10	Recuperaciones relativas (%) obtenidas empleando los diferentes disolventes de extracción con un procedimiento de extracción mediante a) acilación y b) sililación.	235
Figura IV.11	Comparación de las recuperaciones relativas (%) al de mayor respuesta de los diferentes agentes derivatizantes.	237
Figura IV.12	Gráfico de efectos principales del MeP y <i>n</i> -PrP.	240
Figura IV.13	Gráfico de la superficie de respuesta.	240
Figura IV.14	Respuesta relativa (%) del efecto del tiempo de preagitación sobre la derivatización/extracción de los parabenos y el triclosán en aguas residuales de influente.	241
Figura IV.15	Respuesta relativa (%) del efecto del volumen de Ac_2O sobre la derivatización/extracción de los parabenos y el triclosán en aguas residuales de influente.	241

Figura IV.16	Representación de las cinéticas de extracción para parabenos y triclosán.	242 - 243
Figura IV.17	Efecto matriz (%) en la extracción mediante MASE de aguas residuales de efluente e influente.	247
Figura IV.18	Cromatograma de una muestra real de influente (Enero 2010) para parabenos y triclosán (100 ng L ⁻¹ IS) mediante la inyección en el GC-(LVI)-MS/MS.	249
Figura IV.19	Comparación entre los espectros de masas obtenidos con: a) una muestra real y b) un patrón, para el <i>n</i> -PrP (imagen superior) y el triclosán (imagen inferior).	250
Figura IV.20	Recuperaciones (%) obtenidas para dos de los analitos representativos efectuando las eluciones con diferentes disolventes (10 mL).	253
Figura IV.21	Recuperaciones (%) de algunos analitos representativos de parabenos realizando la extracción con diferentes adsorbentes con 10 mL ACN.	254
Figura IV.22	Recuperaciones (%) de algunos analitos representativos de parabenos realizando la extracción con diferentes soportes sólidos en 10 mL de ACN.	255
Figura IV.23	Gráfico de efectos principales del BzP y grasa.	258
Figura IV.24	Gráfico de superficie de respuesta estimada del BzP.	258
Figura IV.25	Gráfico de superficie de respuesta estimada de a) cantidad de soporte sólido (sílice) frente al adsorbente (C ₁₈) con volumen de ACN fijo de 10 mL; b) cantidad de adsorbente frente a volumen de disolvente con una cantidad de soporte sólido fija de 1,2 g; c) cantidad de soporte sólido frente al volumen de ACN con cantidad de adsorbente fija de 4 g.	259
Figura IV.26	Efecto matriz (%) del sistema LC-MS/MS mediante MSPD de mejillón.	262
Figura IV.27	Cromatograma de muestra real de mejillón de roca de los analitos (parabenos) detectados mediante la inyección en el LC-MS/MS.	267
Figura IV.28	Eficacia relativa (%) para PFNA y PFOS con: a) PDMS y b) PES. Datos normalizados respecto al valor máximo de cada analito.	271
Figura IV.29	Eficacia relativa (%) de los PFASs con diferentes porcentajes de NaCl en el estudio de la fuerza iónica empleando PDMS (superior) y PES (inferior). Datos normalizados con respecto al valor máximo de cada analito.	273
Figura IV.30	Factores de concentración obtenidos para PDMS (superior) y PES (inferior) durante la optimización del volumen de muestra.	275
Figura IV.31	Representación de las cinéticas de extracción para PFNA, PFDA, PFDoA y PFOS empleando PDMS (superior) y PES (inferior) como material polimérico extractante.	276
Figura IV.32	Eficacia relativa (%) de los analitos (PFASs) desorbidos por fracción de 100 µL de metanol empleando PDMS (superior) y PES (inferior).	277

Figura IV.33	Eficacia relativa de desorción (%) de PFUnA y PFOS empleando PDMS evaluando tiempos de desorción y ausencia o no de método de sonicación auxiliar.	279
Figura IV.34	Eficacia relativa de desorción (%) de PFUnA y PFOS empleando PES evaluando tiempos de desorción y ausencia o no de método de sonicación auxiliar.	279
Figura IV.35	Efecto matriz (%) en la determinación mediante LC-MS/MS para PDMS (superior) y PES (inferior).	281
Figura IV.36	Efecto matriz (%) del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos realizando la determinación mediante LC-MS/MS para PDMS (superior) y PES (inferior).	283
Figura IV.37	Eficacia de extracción (%) del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos realizando la determinación mediante LC-MS/MS para los PFASs en función del tipo de material extractante (PES frente PDMS).	284
Figura IV.38	Cromatograma de una muestra de agua de mar con adición de 100 ng L ⁻¹ de PFASs mediante la inyección en el LC-MS/MS.	288
Figura IV.39	Recuperaciones (%) de los PFASs extraídos mediante los protocolos optimizados en la bibliografía para Oasis HLB y WAX.	293
Figura IV.40	Recuperaciones (%) obtenidas con cartuchos Oasis WAX para muestras de: a) agua Milli-Q y b) agua de mar sintética.	294
Figura IV.41	Recuperaciones (%) obtenidas para los PFASs realizando los lavados con tampón de NH ₄ OAc frente a lavados realizados con agua Milli-Q.	295
Figura IV.42	Recuperaciones (%) obtenidas para los PFASs al modificar el pH de la muestra de agua de mar sintética.	297
Figura IV.43	Recuperaciones relativas (%) obtenidas tras el estudio del volumen de rotura de muestras de agua de mar sintética extraída con cartuchos: a) Oasis® HLB y b) Oasis® WAX.	298
Figura IV.44	Recuperaciones relativas (%) de PFHxA, PFDoA y PFOS de la segunda etapa de lavado tras emplear diferentes porcentajes de metanol en agua Milli-Q y los eluatos, mediante la extracción con Oasis® HLB (izquierda) y Oasis® WAX (derecha).	300
Figura IV.45	Efectos de matriz (%) obtenidos para los diferentes protocolos de SPE para muestras de: a) mar y b) río.	303
Figura IV.46	Cromatograma de una muestra de mar con adición de PFASs (2 ng L ⁻¹).	305
Figura IV.47	Recuperaciones (%) de los PFASs empleando diferentes soportes sólidos (agentes dispersantes).	312
Figura IV.48	Gráfico de efectos principales del PFHxA (superior) y PFUnA (inferior) obtenidos tras el análisis del diseño Doehlert.	315

Figura IV.49	Gráficas de superficie de respuesta estimada de a) cantidad de soporte sólido (tierra de diatomeas) frente a adsorbente (sílice) con volumen fijo de 20 mL de disolvente (ACN); b) soporte sólido frente a disolvente con cantidad fija de 4 g de adsorbente; c) disolvente frente adsorbente con cantidad fija de 0,2 g de soporte sólido.	316
Figura IV.50	Recuperaciones (%) con desviación estándar de los analitos mediante la extracción con matriz y sólo con la etapa de evaporación.	318
Figura IV.51	Recuperaciones (%) de los analitos evaluando diferentes volúmenes finales empleando MeOH para los lavados.	318
Figura IV.52	Recuperaciones (%) de los analitos evaluando diferentes volúmenes finales empleando ACN para los lavados.	319
Figura IV.53	Efectos de matriz (%) para muestras de berberecho y mejillón.	320
Figura IV.54	Cromatograma de muestra de berberecho con adición a 50 ng g ⁻¹ (línea verde) y berberecho sin adición (línea roja) para los PFASs.	322
Figura IV.55	Eficacias de extracción (%) obtenidas para los FRs tras la extracción con PDMS.	329
Figura IV.56	Eficacias de extracción (%) para los FRs empleando isooctano y acetato de etilo como disolventes de desorción y realizando tres desorciones consecutivas.	330
Figura IV.57	Eficacias de extracción (%) de los FRs evaluando de forma simultánea sonicación y tiempos de desorción, mediante desorción con tres fracciones (unificadas) de acetato de etilo.	331
Figura IV.58	Eficacias de extracción (%) obtenidas para los FRs con diferentes volúmenes de desorción. Columna izquierda: 3 desorciones de 100 µL; columna derecha: 1 desorción con 300 µL.	332
Figura IV.59	Eficacias de extracción (%) de los FRs con diferentes porcentajes de modificador orgánico (metanol) en muestra.	334
Figura IV.60	Eficacias de extracción (%) de los FRs con diferentes porcentajes de NaCl en el estudio de la fuerza iónica.	335
Figura IV.61	Factores de concentración obtenidos para los FRs con los diferentes volúmenes de muestra.	336
Figura IV.62	Perfiles de tiempos de extracción para BDE-47, BDE-153, BDE-209, EHTBB, BTBPE y <i>anti</i> -DP.	337
Figura IV.63	Eficacias relativas de extracción (%) obtenidas para los FRs en el estudio de las pérdidas de analitos en la etapa de filtración.	339
Figura IV.64	Eficacias relativas de extracción (%) obtenidas para los FRs en el estudio de las pérdidas de analitos en la etapa de centrifugación. A: adición tras centrifugación, B: adición antes de centrifugación, C: sin centrifugar.	340

Figura IV.65	Efecto matriz (%) del método de extracción con ad/absorbentes poliméricos-GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs.	344
Figura IV.66	Cromatograma de muestra de agua de mar con adición de 50 ng L ⁻¹ de FRs y 100 ng L ⁻¹ de ISs mediante la inyección en el GC-(NCI)-MS(Q).	346
Figura IV.67	Recuperaciones (%) obtenidas con los diferentes soportes sólidos (agentes dispersantes) para cuatro analitos representativos.	351
Figura IV.68	Recuperaciones (%) obtenidas para los FRs empleando diferentes relaciones muestra/agente dispersante.	352
Figura IV.69	Recuperaciones (%) obtenidas para cuatro FRs representativos con los diferentes disolventes empleando Florisil y sílice acidificada como adsorbentes de limpieza.	354
Figura IV.70	Recuperaciones (%) obtenidas usando diferentes porcentajes de H ₂ SO ₄ en la sílice empleada como adsorbente.	355
Figura IV.71	Recuperaciones (%) obtenidas usando diferentes porcentajes de agua Milli-Q en el Florisil empleado como adsorbente.	356
Figura IV.72	Recuperación relativa (%) obtenida para los FRs tras eluir con tres fracciones de 10 mL de DCM.	358
Figura IV.73	Efecto matriz (%) del equipo GC-(NCI)-MS(Q) para los FRs.	360
Figura IV.74	Cromatograma muestra berberecho con adición de los FRs a 20 ng g ⁻¹ .	362
Ecuación 1	Cálculo de la recuperación o rendimiento de la extracción para técnicas de extracción con ab/adsorbentes.	123
Ecuación 2	Ecuación del factor de concentración.	245
Ecuación 3	Ecuación empleada para el cálculo de los efectos de matriz en la extracción (%).	246
Ecuación 4	Ecuación empleada para el cálculo de los efectos de matriz en el sistema (%).	262



SIGLAS Y ACRÓNIMOS / ABBREVIATIONS AND ACRONYMS



ABS	<i>Acrylonitrile butadiene styrene</i>	<i>Acrilonitrilo butadieno estireno</i>
Ac₂O	<i>Acetic anhydride</i>	<i>Anhídrido acético</i>
AcOH	<i>Acetic acid</i>	<i>Ácido acético</i>
AcOEt	<i>Ethyl acetate</i>	<i>Acetato de etilo</i>
ADI	<i>Admissible daily intake</i>	<i>Ingesta diaria admisible</i>
APCI	<i>Atmospheric-pressure ionization</i>	<i>Ionización química a presión atmosférica</i>
API	<i>Atmospheric-pressure chemical interface</i>	<i>Interfase a presión atmosférica</i>
APPI	<i>Atmospheric-pressure photoionization</i>	<i>Fotoionización a presión atmosférica</i>
ASE	<i>Accelerated solvent extraction</i>	<i>Extracción acelerada con disolventes</i>
B	<i>Magnetic sector mass analyzer</i>	<i>Analizador de sector magnético</i>
BCF	<i>Bioconcentration factor</i>	<i>Factor de bioconcentración</i>
BMF	<i>Biomagnification factor</i>	<i>Factor de biomagnificación</i>
BFRs	<i>Brominated flame retardants</i>	<i>Pirorretardantes bromados</i>
BSA	<i>n,o -bis(trimethylsilyl)acetamide</i>	<i>n,o -bis-(trimetilsilil)acetamida</i>
BSTFA	<i>n,o-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>	<i>n,o-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida</i>
bw	<i>Body weight</i>	<i>Peso corporal</i>
CCTEMA	<i>Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment</i>	<i>Comité científico de la Toxicidad, la Ecotoxicidad y Medioambiente</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>	<i>Electroforesis capilar</i>
CEPA	<i>Canadian Environmental Protection Act</i>	<i>Ley Canadiense de Protección Ambiental</i>
CI	<i>Chemical ionization</i>	<i>Ionización química</i>
CNPr	<i>Cyanopropyl</i>	<i>Cianopropil</i>
CONTAM	<i>Panel on Contaminants in the Food Chain</i>	<i>Comité Científico de Contaminantes de la Cadena Alimentaria</i>
COT	<i>Committee on Toxicity</i>	<i>Comité sobre la Toxicidad</i>
CRM	<i>Certificate Reference Material</i>	<i>Material de Referencia Certificado</i>
DC	<i>Direct current</i>	<i>Corriente continua</i>

DCDD	<i>2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin</i>	<i>2,8-diclorodibenzodioxina</i>
DCM	<i>Dichloromethane</i>	<i>Diclorometano</i>
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>	<i>Microextracción líquido-líquido dispersiva</i>
DLLME-SFO	<i>DLLME based on the solidification of a floating organic drop</i>	<i>DLLME basado en la solidificación de una gota orgánica</i>
dr	<i>Dry residue</i>	<i>Residuo seco</i>
DSL	<i>Domestic Substance List</i>	<i>Lista de Sustancias Domésticas</i>
DVB	<i>Divinylbenzene</i>	<i>Divinilbenceno</i>
dw	<i>Dry weight</i>	<i>Peso seco</i>
ECD	<i>Electronic capture detector</i>	<i>Detector de captura electrónica</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	<i>Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria</i>
EI	<i>Electronic Impact</i>	<i>Impacto electrónico</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>	<i>Agencia de Protección Ambiental</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>	<i>Ionización por electrospray</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>	<i>Etanol</i>
EU	<i>European Union</i>	<i>Unión Europea</i>
FASAs	<i>Perfluoroalkane sulphonamide</i>	<i>Sulfamida de perfluoro alcano</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	<i>Agencia de Drogas y Alimentos</i>
FID	<i>Flame ionization detector</i>	<i>Detector de ionización de llama</i>
FRs	<i>Flame Retardants</i>	<i>Retardantes de llama o piroretardantes</i>
FS	<i>Flat sheets</i>	<i>Membranas planas</i>
FS-MMLLE	<i>Flat sheet microporous liquid-liquid membrane</i>	<i>Extracción líquido-líquido con membranas microporosas</i>
FTOHs	<i>Fluorotelomer alcohol</i>	<i>Alcoholes fluoroteloméricos</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>	<i>Cromatografía de gases</i>
GPC	<i>Gel permeation chromatography</i>	<i>Cromatografía de permeación en gel</i>

GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>	<i>Generalmente reconocidos como seguros</i>
HBCDs	<i>Hexabromocyclododecane</i>	<i>Hexabromociclododecano</i>
HF	<i>Hollow fiber</i>	<i>Fibra hueca</i>
HF-LPME	<i>Hollow-fiber liquid-phase microextraction</i>	<i>Microextracción en fase líquida con fibra hueca</i>
HFRs	<i>Halogenated flame retardants</i>	<i>Retardantes de llama halogenados</i>
HIPS	<i>High impact polystyrene</i>	<i>Poliestireno de alto impacto</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	<i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>
HPV	<i>High production volume substance</i>	<i>Sustancia de elevado volumen de producción</i>
HS	<i>Head space</i>	<i>Espacio de cabeza</i>
iBCF	<i>Isobutylchloroformate</i>	<i>Cloroformiato de isobutilo</i>
ICP	<i>Inductively coupled plasma</i>	<i>Plasma acoplado inductivamente</i>
IS	<i>Internal Standard</i>	<i>Patrón interno</i>
IT	<i>Ion trap</i>	<i>Trampa de iones</i>
K_{ow}	<i>Octanol-water partition constant</i>	<i>Constante de partición octanol-agua</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>	<i>Cromatografía líquida</i>
LC₅₀	<i>Lethal concentration</i>	<i>Concentración letal media</i>
LD	<i>Liquid desorption</i>	<i>Desorción líquida</i>
LD₅₀	<i>Lethal dose</i>	<i>Dosis letal media</i>
LDPE	<i>Low density polyethylene</i>	<i>Polietileno de baja densidad</i>
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>	<i>Extracción líquido-líquido</i>
LOD	<i>Limit of detection</i>	<i>Límite de detección</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>	<i>Límite de cuantificación</i>
LPV	<i>Low production volume</i>	<i>Volumen de producción bajo</i>
LVI	<i>Large volume injector/injection</i>	<i>Inyector/inyección de grandes volúmenes</i>

lw	<i>Lipidic weight</i>	<i>Peso lipídico</i>
MAE	<i>Microwave assisted extraction</i>	<i>Extracción asistida con microondas</i>
MASE	<i>Membrane-assisted solvent extraction</i>	<i>Extracción con disolvente asistida por membrana</i>
MALLE	<i>Membrane-assisted liquid-liquid extraction</i>	<i>Extracción líquido-líquido asistida por membrana</i>
MeOH	<i>Methanol</i>	<i>Metanol</i>
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbents</i>	<i>Microextracción con adsorbentes empaquetados</i>
MESI	<i>Membrane extraction with sorbent interface</i>	<i>Extracción con membrana con interfase adsorbente</i>
MIPs	<i>Molecular imprinted polymers</i>	<i>Polímeros de impresión molecular</i>
MLPME	<i>Membrane-based liquid-phase microextraction</i>	<i>Microextracción en fase líquida asistida con membranas</i>
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>	<i>Monitorización de reacción múltiple</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>	<i>Espectrometría de masas</i>
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>	<i>Espectrometría de masas en tándem</i>
MSPD	<i>Matrix solid-phase dispersion</i>	<i>Dispersión de la matriz en fase sólida</i>
MSTFA	<i>n-methyl-n-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>	<i>n-metil-n-(trimetilsilil)trifluoroacetamida</i>
MTBE	<i>methyl tert-butyl ether</i>	<i>metil tert-butil éter</i>
MTBSTFA	<i>n-methyl-n-(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>	<i>n-metil-n-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida</i>
MTCS	<i>Methyl triclosan</i>	<i>Metiltriclosán</i>
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>	<i>Relación masa/carga</i>
NBFRs	<i>New brominated flame retardants</i>	<i>Nuevos retardantes de llama bromados</i>
NCI	<i>Negative chemical ionization</i>	<i>Ionización química negativa</i>
NFRs	<i>New flame retardants</i>	<i>Nuevos retardantes de llama</i>
NH₄OAc	<i>Ammonium acetate</i>	<i>Acetato amónico</i>
OCPs	<i>Organochlorine pesticides</i>	<i>Pesticidas organoclorados</i>

OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>	<i>Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo</i>
OPPs	<i>Organophosphorus pesticides</i>	<i>Pesticidas organofosforados</i>
PA	<i>Polyacrilate</i>	<i>Poliacrilato</i>
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>	<i>Hidrocarburos policíclicos aromáticos</i>
PBBs	<i>Polybrominated biphenyls</i>	<i>Bifenilos polibromados</i>
PBDEs	<i>Polybrominated diphenyl ethers</i>	<i>Éteres de difenilo polibromados</i>
PBT	<i>Persistent, bioaccumulatives and toxics</i>	<i>Persistentes, bioacumulativos y tóxicos</i>
PC	<i>Polycarbonate</i>	<i>Policarbonato</i>
PCBs	<i>Polychlorinated biphenyls</i>	<i>Bifenilos policlorados</i>
PCI	<i>Positive chemical ionization</i>	<i>Ionización química positiva</i>
PCPs	<i>Personal care products</i>	<i>Productos de cuidado personal</i>
PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i>	<i>Polidimetilsiloxano</i>
PEEK	<i>Polyetherketone</i>	<i>Polietercetona</i>
PES	<i>Polyethersulphone</i>	<i>Polietersulfona</i>
PFAAs	<i>Perfluoroalkyl acids</i>	<i>Ácidos perfluoroalquilados</i>
PFASs	<i>Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances</i>	<i>Sustancias per- y poli-fluoroalquiladas</i>
PFBBr	<i>Pentafluoruro benzyl bromide</i>	<i>Bromuro de pentafluorobencilo</i>
PFCAs	<i>Perfluoroalkyl carboxylic acids</i>	<i>Ácidos carboxílicos perfluorados</i>
PFRs	<i>Phosphorated flame retardants</i>	<i>Retardantes de llama organofosforados</i>
PFSAs	<i>Perfluoroalkyl sulfonic acid</i>	<i>Ácidos perfluoro alquil sulfónicos</i>
PLE	<i>Pressurized liquid extraction</i>	<i>Extracción con líquidos presurizados</i>
POPs	<i>Persistent organic pollutants</i>	<i>Contaminantes orgánicos persistentes</i>
PP	<i>Polypropylene</i>	<i>Polipropileno</i>
ppt	<i>Parts per trillion</i>	<i>Partes por trillón</i>
PSA	<i>Primary-secondary amine bonded silica</i>	<i>Sílice enlazada a amina primaria-secundaria</i>
PS-DVB	<i>Styrene-divinylbenzene</i>	<i>Estireno-divinilbenceno</i>
PTV	<i>Programmed temperature vaporizer</i>	<i>Vaporizador de temperatura programada</i>

PUF	<i>Polyurethane foam</i>	<i>Espuma de poliuretano</i>
P_v	<i>Vapor pressure</i>	<i>Presión de vapor</i>
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i>	<i>Cloruro de polivinilo</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>	<i>Fluoruro de polivinilideno</i>
PVP-DVB	<i>Polyvinylpyrrolidone-divinylbenzene</i>	<i>Poli(N-vinilpirrolidona-divinilbenceno)</i>
Py	<i>Pyridine</i>	<i>Piridina</i>
Q	<i>Quadrupole analyzer</i>	<i>Analizador cuadrupolar o cuadrupolo</i>
QqQ	<i>Triple quadrupole analyzer</i>	<i>Analizador de triple cuadrupolo</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>	<i>Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las Sustancias y Preparados Químicos</i>
RF	<i>Radio frequency</i>	<i>Radiofrecuencia</i>
SBSE	<i>Stir-bar sorptive extraction</i>	<i>Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras</i>
SCCNFP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers</i>	<i>Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios Destinados a los Consumidores</i>
SCCP	<i>Scientific Committee on Consumer Products</i>	<i>Comité Científico de los Productos de Consumo</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>	<i>Comité Científico de Seguridad de los Consumidores</i>
SCFS	<i>Norwegian Scientific Committee for Food Safety</i>	<i>Comité Científico de Seguridad Alimentaria</i>
SD	<i>Standard deviation</i>	<i>Desviación estándar</i>
SDME	<i>Single-drop microextraction</i>	<i>Microextracción con gota suspendida</i>
SFE	<i>Supercritical fluid extraction</i>	<i>Extracción asistida con fluidos supercríticos</i>
SIM	<i>Selective ion monitoring</i>	<i>Monitorización de ion selectivo</i>
SLE	<i>Solid-liquid extraction</i>	<i>Extracción sólido líquido</i>
SLM	<i>Supported liquid membrane</i>	<i>Extracción con membranas líquidas</i>
SME	<i>Solvent microextraction</i>	<i>Microextracción con disolvente</i>

S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i>	<i>Relación señal/ruido</i>
SNUR	<i>Significant New Use Rule</i>	<i>Nueva Regla Significativa del Uso</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>	<i>Extracción en fase sólida</i>
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i>	<i>Microextracción en fase sólida</i>
SVHC	<i>Substances of Very High Concern</i>	<i>Sustancias Extremadamente Preocupantes</i>
$t_{1/2}$	<i>Half-life</i>	<i>Tiempo de vida media</i>
TBA	<i>Tetrabutylammonium</i>	<i>Tetrabutilamonio</i>
TBAHS	<i>Tetrabutylammonium hydrogensulfate</i>	<i>Hidrogeno sulfato de tetrabutilamonio</i>
TBBPA	<i>Tetrabromobisphenol A</i>	<i>Tetrabromobisfenol A</i>
TBDMS	<i>tert-butyl dimethylsilane</i>	<i>tert-butil dimetilsilano</i>
TBH	<i>Tetrabutylammonium hidroxide</i>	<i>Hidróxido de tetrabutilamonio</i>
TD	<i>Thermal desorption</i>	<i>Desorción térmica</i>
TDI	<i>Tolerable daily intake</i>	<i>Ingesta diaria tolerable</i>
THF	<i>Tetrahydrofurane</i>	<i>Tetrahidrofurano</i>
TMCS	<i>Trimethylchlorosilane</i>	<i>Trimetilclorosilano</i>
TMS	<i>Trimethylsilane</i>	<i>Trimetilsilano</i>
ToF	<i>Time of flight analyzer</i>	<i>Analizador de tiempo de vuelo</i>
TrBA	<i>Tributylamine</i>	<i>Tributilamina</i>
UA-DLLME	<i>Ultrasonic-assisted DLLME</i>	<i>DLLME asistida por ultrasonidos</i>
UAE	<i>Ultrasound assisted extraction</i>	<i>Extracción asistida por ultrasonidos</i>
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i>	<i>Programa Medioambiental de las Naciones Unidas</i>
U(H)PLC	<i>Ultra(high) performance liquid chromatography</i>	<i>Cromatografía líquida de ultra (alta) resolución</i>
USA	<i>United States of America</i>	<i>Estados Unidos de América</i>
USAEME	<i>Ultrasound assisted emulsification-microextraction</i>	<i>Microextracción por emulsión asistida por ultrasonidos</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>	<i>Ultravioleta</i>
UV-VIS	<i>Ultraviolet-visible</i>	<i>Ultravioleta-visible</i>

VIS	<i>Visible</i>	<i>Visible</i>
VTG	<i>Vitellogenesis</i>	<i>Vitelogénesis</i>
ww	<i>Wet weight</i>	<i>Peso húmedo</i>
w/w	<i>Weight/weight ratio</i>	<i>Relación peso/peso</i>
WWTP	<i>Wastewater treatment plant</i>	<i>Estación depuradora de aguas residuales</i>





ANEXOS



1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

A continuación, se presenta un listado de los artículos científicos publicados o en preparación derivados del trabajo de la presente Tesis Doctoral:

- E. Villaverde-de-Sáa, I. González-Mariño, J.B. Quintana, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela.
In-sample acetylation-non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction for the determination of parabens and triclosan in water samples.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397 (2010) 2559-2568
[DOI: 10.1007/s00216-010-3789-2](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3789-2)
- E. Villaverde-de-Sáa, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Ferrero-Refojos, E. Rubí, R. Cela.
Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402 (2012) 509-518
[DOI: 10.1007/s00216-011-5302-y](https://doi.org/10.1007/s00216-011-5302-y)
- E. Villaverde-de-Sáa, I. Racamonde, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela.
Ion-pair sorptive extraction of perfluorinated compounds from water with low-cost polymeric materials: polyethersulfone vs polydimethylsiloxane.
Analytica Chimica Acta, 740 (2012) 50-57
[DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.027](https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.027)
- C. Valls-Cantenys, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, M. Iglesias, V. Salvadó, R. Cela.
Application of polydimethylsiloxane rod extraction to the determination of sixteen halogenated flame retardants in water samples.
Analytica Chimica Acta, 770 (2013) 83-93
[DOI: 10.1016/j.aca.2013.01.059](https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.059)
- E. Villaverde-de-Sáa, C. Valls-Cantenys, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela.
Matrix solid-phase dispersion combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of fifteen halogenated flame retardants in mollusks.
Journal of Chromatography A, 1300 (2013) 85-94.
[DOI: 10.1016/j.chroma.2013.05.064](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.064)
- E. Villaverde-de-Sáa, M. Fernández-López, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Racamonde, R. Cela.
Solid-phase extraction of perfluoroalkylated compounds from sea water.
Journal of Separation Science, 38 (2015) 1942-1950
[DOI: 10.1002/jssc.201401453](https://doi.org/10.1002/jssc.201401453)

- E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela.
Matrix solid-phase dispersion combined to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of paraben preservatives in mollusks.
Journal of Chromatography A, 1459 (2016) 57-66
[DOI: 10.1016/j.chroma.2016.06.070](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.070)
- E. Villaverde-de-Sáa, J. Cobas, J.B. Quintana, R. Rodil, R. Cela, N. Carro.
Levels and trends of organochlorine compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, brominated and novel flame retardants, UV filters and perfluorinated chemicals in mollusks from Galicia. (Título provisional)
En preparación.

2. OTRAS PUBLICACIONES

A continuación, se recogen otros artículos en los que se ha participado durante la etapa de formación, si bien no forman parte del trabajo que constituye esta Tesis Doctoral:

- I. Racamonde, E. Villaverde-de-Sáa, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela.
Determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography-mass spectrometry.
Journal of Chromatography A, 1245 (2012) 167-174
[DOI: 10.1016/j.chroma.2012.05.017](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.017)
- I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, E. Villaverde-de-Sáa, R. Cela.
Determination of benzodiazepines, related pharmaceuticals and metabolites in the water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Journal of Chromatography A, 1352 (2014) 69-79
[DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.064](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.064)
- G. Pawar, M. Abou-Elwafa Abdallah, E. Villaverde-de-Sáa, S. Harrad.
Dermal bioaccessibility of flame retardants from indoor dust and the influence of topically applied cosmetics.
Journal of Exposure Science and Epidemiology, 27 (2017) 100-105
DOI:10.1038/jes.2015.84